

(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2005-535342

(P2005-535342A)

(43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 O 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
		4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 124 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-529297 (P2004-529297)	(71) 出願人	592257310
(86) (22) 出願日	平成15年8月8日 (2003.8.8)		プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月8日 (2005.4.8)		・ハーバード・カレッジ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/025016		アメリカ合衆国 O 2 1 3 8 マサチューセツ
(87) 国際公開番号	W02004/016726		州ケンブリッジ、クウインシー・ストリ
(87) 国際公開日	平成16年2月26日 (2004.2.26)		ート 1 7
(31) 優先権主張番号	60/402, 254	(74) 代理人	100127878
(32) 優先日	平成14年8月9日 (2002.8.9)		弁理士 遠藤 淳二
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	シンクレア, デイビッド, エー.
(31) 優先権主張番号	60/428, 614		アメリカ合衆国 マサチューセツ州 O
(32) 優先日	平成14年11月22日 (2002.11.22)		2 1 3 2 ウェスト ロックスベリー プ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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、ストレス耐性を増す方法及び組成物

(57) 【要約】

本発明は、真核及び原核細胞の寿命を調節したり、細胞を熱ショックなどの特定のストレスから保護するための方法及び組成物を提供するものである。方法の1つは、細胞内のNAD⁺再利用経路を通る流れを、例えば、NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2から成る群より選択される1つ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、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】

細胞の寿命又はそのストレス耐性を調節する方法であって、前記細胞内の NAD^+ 再利用率を通る流れを調節するステップを含む、方法。

【請求項 2】

NAD^+ 再利用率を調節する前記ステップが、NPT1、PNC1、NMA1 及びNMA2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】

調節が増加させることであり、前記方法が、NPT1、PNC1、NMA1 及びNMA2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増加させるステップを含む、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

NPT1、PNC1、NMA1 及びNMA2 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 1 つの核酸、又は、細胞内の前記 NAD^+ 再利用率を通る流れを増加させるために十分な、少なくともその一部分、を細胞内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 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をコードする少なくとも 5 つのヌクレオチド配列、又は、細胞内の前記 NAD^+ 再利用率を通る流れを増加させるために十分な、少なくともその一部分、を細胞内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 及びNMA2 から成る群より選択される少なくとも 1 つのタンパク質、又は、細胞内の前記 NAD^+ 再利用率を通る流れを増加させるために十分な、少なくともその一部分、を細胞内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 7】

細胞の寿命又はそのストレス耐性を調節する方法であって、前記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、方法。

【請求項 8】

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。

30

【請求項 9】

細胞の寿命を、少なくとも約 40 %、延ばす、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。

【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。

40

【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】

ストレスが熱ショック浸透圧ストレス；DNA損傷性作用因子；不適切な塩レベル；不適切な窒素レベル、又は不適切な栄養レベルである、請求項 1 又は 7 に記載の方法。

【請求項 15】

NAD^+ 再利用率を通る流れを調節するステップが、基本的に NAD^+ 及び NADH の定常状態レベルを変えずに行われる、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ストレス耐性を調節する化合物を特定する方法であって、

50

(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タンパク質を、検査化合物に、前記タンパク質の活性に影響するのに充分であろう時間、接触させるステップと、

(i i) 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で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ストレス耐性を調節する化合物であることを示す、ステップと

を含む方法。

【請求項 17】

細胞の寿命、又は、そのストレス耐性を調節する化合物を特定する方法であって、

10

(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核酸を、レポータ遺伝子に作動上連結させて含む細胞又はライセートを、検査化合物に、前記転写調節核酸に影響するのに充分であろう時間、接触させるステップと、(i i) 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、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で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、そのストレス耐性を調節する化合物であることを示す、ステップと

を含む方法。

【請求項 18】

細胞を前記検査化合物に接触させるステップと、細胞の寿命又はその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む、請求項 17 又は 18 に記載の方法。

20

【請求項 19】

Sir2ファミリー・メンバの活性の阻害剤を特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、分子又は分子複合体の一組の構造座標を提供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、

(i i) 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提供するステップと、

(i i i) 前記化学的実体が、前記分子又は分子複合体に結合する又は干渉すると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に結合又は干渉することは、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

30

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特定する方法であって

(i) 少なくともC ポケットを含むSir2ファミリーのタンパク質を、検査化合物に、前記検査化合物が前記Sir2ファミリーのタンパク質のC ポケットにおそらくは結合するのに充分な時間、接触させるステップと、

40

(i i) タンパク質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べたときに、前記検査化合物の存在下で、前記タンパク質の活性が低いことは、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を示す、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予防する方法であって、細胞死又は老化に易罹患性又は罹患性の細胞においてNAD⁺ 再利用経路を通る流れを増加させる、又は、細胞内のニコチンアミドレベルを下げる作用薬を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、方法。

50

【請求項 23】

細胞の寿命を下げる、又は細胞をストレスに対してより感受性とすることが有益であるような障害を治療又は予防する方法であって、対象の NAD^+ 再利用経路を通る流れを減らす、又は、細胞内のニコチンアミドレベルを増加させる作用薬を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

生理学的研究や、より最近の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裏付けられている。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の構成に比較的小さな変化があっても、老化プロセスが劇的に遅くなることが実証されている。例えば、数多くの多様な生物の寿命は、単にカロリー制限と呼ばれる食餌療法でカロリー摂取を制限するだけで、大きく延ばすことができる(1 - 3)。

【0002】

なぜ単純な変化が、このような深遠な効果を老化などの複雑なプロセスにもたらすのであろうか？すべての真核生物は、老化の速度を支配している驚くべき保存された調節系を持つという画が浮かびつつある。このような調節系は、資源を、成長及び生殖から、ストレス耐性をもたらす経路へと方向修正することにより、生物が逆境を生き延びられるようにするために、進化の過程で生じたのかも知れない(4, 6)。

【0003】

老化の調節因子の解明で特に有用であることが判明したモデルの一つは、出芽酵母、*S. cerevisiae* (原語: *S. cerevisiae*) である。*S. cerevisiae* の複製寿命は、典型的には、個々の「母細胞」が生ずる「娘細胞」の出芽の数であると定義されている(7)。母細胞は、大きさの増加、細胞周期の鈍化、仁の肥大、定常状態 NAD^+ レベルの増加、糖新生及びエネルギー貯蔵の増加、テロメア及び接合型遺伝子座におけるサイレント状態が失われることによる不稔性を含め、年齢依存的な変化を起こす(8 - 13)。酵母寿命の別の尺度は、暦老化として知られ、非分裂細胞の集団が、栄養物質を絶たれたときに生存した状態に留まる時間の長さである(14)。暦寿命の増加は、熱ショック及び酸化ストレスに対する耐性の高まりと相関関係にあり、細胞成分への損傷の累積が、この種類の老化の大きな原因であることが示唆されている(14, 15)。複製老化及び暦老化の間の重複の程度は、現在のところ不明である。

【0004】

酵母複製老化の原因の一つは、反復したリボゾームDNA (rDNA) 遺伝子座の不安定性から生ずることが示されている(16)。この不安定性のために、複製はするが分裂して娘細胞になることができないERCと呼ばれる環状の形のrDNAが生ずる。最終的には、ERCは1000コピーを越えるまで蓄積し、これが、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 欠失など、DNA組換えを減らす療法が、複製寿命を延ばす。

【0005】

酵母において老化の鍵となる調節物質は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+) 依存的デアセチラーゼであるSir2サイレンシングタンパク質(17)である(21 - 24)。Sir2は、テロメア及び2つのサイレント接合型遺伝子座において、サイレントなヘテロクロマチンの形成を触媒するヘテロ三量体型Sir2/3/4複合体の一成分である(25)。Sir2はまた、rDNA遺伝子座でのサイレント状態や終期から出るのに必要なRENT複合体の一成分でもある。さらにこの複合体については、Pol IによるrRNAの転写を直接刺激したり、仁構造の調節に関与していることが最近示されている(28)。

【0006】

生化学的研究では、Sir2、はヒストンH3及びH4のアミノ末端のテイルを容易に脱アセチル化して、1-O-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

10

20

30

40

50

とが示されている(21 - 23, 29)。SIR2のコピーを付加的に持つ株は、rDNAサイレント状態の増加や(30)、30%長い寿命を示す(17)。最近では、C.エレガンス(原語:C. elegans)のSIR2相同体である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が示されている(31)。このことは、老化のためのSIR依存調節経路は進化の早い段階で生じ、よく保存されてきたことを意味している(4)。酵母の寿命も、後生動物のそれと同様に、カロリー制限に似た介入により引き延ばされている(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)経路の活性を減らす変異は、野生型細胞では寿命を延ばすが、変異sir2株では延ばさないことから、SIR2は、カロリー制限経路の下流にある鍵となる成分であることが分かる(19)。

10

【0007】

大半の生物では、2つのNAD⁺生合成経路がある(図1を参照されたい)。NAD⁺は、トリプトファンからde novo合成されたり、また、ニコチンアミドからNAD⁺再利用経路を通る4つの段階を経て再循環する場合がある。細菌NAD⁺再利用経路の一番目の段階では、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が、pncA遺伝子産物により触媒される(33)。pncAに対して相同性のS.セレビジエの遺伝子YGL037は最近、名称PNC1(SGD)を与えられている(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、この反応からのニコチン酸をニコチン酸モノヌクレオチド(NaMN)に転化させる(35 - 38)。この時点で、NAD⁺再利用経路及びde novo NAD⁺経路が一つになり、NaMNが、デスアミド-NAD⁺(NaAD)に、ニコチン酸モノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ(NaMNAT)により転化させられる。S.セレビジエでは、YLR328(39)と、特徴付けがまだ済んでいないORFであるYGR010という、細菌NaMNAT遺伝子に対して相同性を持つ2つの推定ORFがある(23, 39)。我々はこれら2つのORFをそれぞれNMA1及びNMA2と言及する。サルモネラでは、NAD⁺の再生の最終段階は、NADシンセターゼにより触媒される(40)。まだ特徴付けの済んでいないORFのQNS1は、NADシンセターゼをコードしていると予測される(23)。

20

【0008】

酵母では、NPT1にヌル変異があると、定常状態のNAD⁺レベルが、最高2分の1に減少して(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延ばすかを説明する現在の仮説の一つは、代謝活性の低下が、NAD⁺レベルの増加を引き起こし、こうしてSir2活性を刺激する、というものである(Campisi, 2000及びGuarente, 2000にレビュー)。

30

【0009】

転写のサイレント状態は、ゲノム中の異なる部位でのクロマチンの遺伝性の修飾に関係している。サイレント状態とは、それがプロモータ非特異的であり、しばしばゲノム遺伝子座全体を包含する場合に長距離リプレッションと呼ばれる(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に、DNAのこのようなサイレント領域には、幅広い修飾が起き易い(3')。これらの修飾で最もよくなされた研究の中に、ヒストンの可逆的アセチル化がある(4, 5にレビュー)。

【0010】

ヒストンのアセチル化状態に影響する2つの種類の酵素がある：ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)及び対抗するヒストンデアセチラーゼ(HDAC)である。ゲノムのより転写活性な区域と比較すると、クロマチンのサイレント領域内にあるヒストンは、特にコア・ヒストンH3及びH4のNH₂末端テイル上で、低アセチル化していることが知られている(6')。3つのクラスのヒストンデアセチラーゼが解説されており、また、酵母タンパク質に対する相同性に基づいて分類されている。クラスI(Rpd3様)及びクラスII(Hda1様)のタンパク質は、阻害剤トリコスタチンA(TSA)へのそれらの感受性により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これらのタンパク質の関与を含め、これらの細胞内での働きに関して豊富な情報が得られた(9'にレビュー)。

40

50

【 0 0 1 1 】

酵母Sir2 は、クラスⅠⅠⅠ HDACの始祖ファミリーである。Sir2様デアセチラーゼはTSAによって阻害されず、 NAD^+ 依存的であるという固有の特徴を有する (1 0 ' - 1 3 ')。このクラスのタンパク質は、細菌からヒトまで、幅広い種類の生物に見られる。酵母のHst2及びヒトのSIRT2という少なくとも2種のSir2相同体が細胞質に局在しており、ヒトSIRT1は最近、p53を脱アセチル化の標的とすることが示された (1 1 ' 1 3 ' - 1 5 ')。これらの結果は、このファミリーのメンバのすべてが、ヒストン又は他の核内基質に特異的という訳ではないことを示している。

【 0 0 1 2 】

サイレント情報調節因子 (SIR) というこの用語は、当初、S. セレビジエで接合型遺伝子座 (HML及びHMR) 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 (1 6 ')。酵母でのサイレント状態はまた、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 ' , 1 7 ')。接合型遺伝子座と、酵母テロメアのポリ (TG₁₋₃) 管でのヘテロクロマチンの形成は、Sir2、Sir3 及びSir4 (1 8 , 1 9) のヘテロ三量体型複合体によって媒介される。rDNA遺伝子座においては、Sir2は、Net1及びCdc14を含むRENT (regulator of nucleolar silencing and telophase exit) 複合体の一部である。これらのタンパク質のうちで、Sir2は、これら3つのサイレント領域すべてで、サイレント状態にとって不可欠な唯一の因子である (2 2 ' - 2 4 ')。

【 0 0 1 3 】

酵母rDNA遺伝子座 (RDN1) は、100-200 回タンデムに反復した9 kbのユニットから成り、リボゾームRNAをコードしている。酵母の老化の主要な原因は、染色体外rDNA環 (ERC) の切り出しにつながる、これらの反復間の組換えから生ずる (2 5 ' - 2 7 ') ことが示されている。ERCは複製はするが分離して娘細胞になることはできず、従って細胞分裂時には指数関数的に増幅される。ERCは、古い細胞の酵母ゲノム全体のそれよりも大きなDNA含有量になるまで蓄積することがあり、必須な転写及び/又は複製因子を滴定することにより、細胞を致死させると考えられている (2 8 ')。Sir2 は、rDNAに一体化されたPol II転写型遺伝子をサイレント状態にするが、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の証拠がある。SIR2 を欠失させるとrDNAサイレント状態が消え、マーカ遺伝子がrDNAの外で組換えられる頻度が10倍に増加する (2 9 ')。その結果、ERCの形成が増し、寿命が劇的に短縮される (2 9 ' , 3 0 ')。

【 0 0 1 4 】

Sir2は酵母の長寿を制限する一要素である。SIR2遺伝子のコピーが余分に一つでもあると、組換えが抑制されて寿命が40%延びる (2 6 ' , 3 1 ' , 3 2 ')。最近、SIR2が、検査された生物すべてで寿命を延ばす療法であるカロリー制限によりもたらされる寿命の延び (3 1 ") に必須であることが示された。さらに、Sir2相同体である sir2.1 を多量に投与すると、線虫C. エレガンスの寿命が延びることが示されており (3 3 ')、最も近いヒトの相同体SIRT1は、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 (3 4 ' , 3 5 ')。これらの発見は、Sir2及びその相同体は、細胞及び生物レベルで生存を調節する保存された役割を有していることを示している。

【 0 0 1 5 】

最近、Sir2様デアセチラーゼの生化学的性質に大きな洞察が得られた (3 6 ' 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 (1 0 ' , 1 2 ' , 1 3 ')。TSA感受性HDACはコ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。これにより、この共基質の利用能の違いを通じて、Sir2の活性の調節が可能になっている (1 0 ' - 1 3 ')。Sir2の脱アセチル化は、 NAD^+ のADP-リボース成分をニコチンアミドに繋げている高エネルギーグリコシド結合の切断に接続している。切断が起きると、Sir2は、アセチル基のADP-リボースへの移動を触媒する (1 0 ' , 1 1 ' , 1 5 ' , 3 7 ')。この移動反応の生成物はO-アセチル-ADP-リボースという、新規な代謝産物であり、これが、細胞周

10

20

30

40

50

期での遅れ / 遮断を引き起こしたり、胚の卵子成熟を引き起こすことが最近、示された (38')。

【 0016 】

脱アセチル化の他方の産物は、ニコチン酸の前駆物質であり、ビタミンB3の一つの形であるニコチンアミドである (39')。高用量のニコチンアミド及びニコチン酸がしばしば、不安、変形性関節症、精神病を含むある範囲の状態を自己治療するために交換可能に用いられており、ニコチンアミドは現在、癌及びI型糖尿病の治療法として臨床試験中である (40')。これらの治療に用いられる高用量の長期安全性は疑問視されており (41')、これらの化合物の分子レベルでの効果の可能性は明らかではない。

【 0017 】

発明の概要

ある実施態様では、本発明は、細胞内の NAD^+ 再利用経路を通る流れを調節するステップを含む、細胞の寿命やそのストレスへの耐性を調節する方法を提供するものである。本方法は、細胞内の NAD^+ 再利用経路を通る流れを増加させるステップを含む、細胞の寿命を増加又は延命させること、又は、そのストレスへの耐性を増すことを含むものである。 NAD^+ 再利用経路を通る流れの調節は、 NAD^+ 及び NADH の定常状態レベルを基本的に変えることなく、そして基本的には細胞内の NAD^+ / NADH 比を維持することにより、起こさせられよう。

【 0018 】

NAD^+ 再利用経路を通る流れを増加させるステップは、NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2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増加させるステップを含むであろう。該方法は、細胞内に、NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2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1つの核酸、又は、ある遺伝子の少なくとも5個のコピーを含む核酸、を導入するステップを含むものでもよい。代替的には、該方法は、細胞内に、NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2から成る群より選択される少なくとも1つのタンパク質を導入するステップを含むものでもよい。該方法は、細胞を、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薬に接触させるステップを含んでもよい。該細胞は少なくとも約40%長く生きる場合、又は少なくとも約60%長く生きる場合もあるであろう。

【 0019 】

さらに本発明は、細胞内の NAD^+ 再利用経路を通る流れ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損傷性作用因子 (例えば紫外線)、及び適切でない窒素レベルなどのストレスに対する細胞の耐性を増す方法も提供する。

【 0020 】

ある実施態様では、細胞の寿命を調節するステップは、細胞内のサイレント状態を調節するステップを含む。サイレント状態には、テロメアのサイレント状態や、rDNAの組換えが含まれよう。

【 0021 】

その寿命を延ばすことのできる、あるいは、それをストレスから保護することのできる細胞は、酵母細胞などの真核細胞、又は、細菌細胞などの原核細胞であってよい。当該細胞は *in vitro* にあっても、又は *in vivo* にあってもよい。

【 0022 】

別の実施態様では、細胞の寿命又はその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を調節するステップを含む。例えば、細胞の寿命を低下させるステップ、又は、細胞をストレスにより感受性にするステップは、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んでもよい。これは、細胞を、約1乃至20 mM、好ましくは約2乃至10 mMの量のニコチンアミドに接触させるステップを含んでもよい。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関与する酵素のレベル又は活性を増したり、又は、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らすことによって、増加させられよう。ニコチンアミドを失活させる酵素には ; PNC1 ; ニ

10

20

30

40

50

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) ; NPT1 及びそのヒト相同体 ; 並びに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。

【 0 0 2 3 】

反対に、細胞の寿命を増すステップ、又は、細胞をストレスにより耐性にする (即ち感受性を低くする) ステップは、細胞内のニコチンアミドのレベルを低下させるステップを含んでもよい。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減らしたり、又は、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すことによって、達成されよう。従って、細胞の寿命又はストレス耐性を増すステップは、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NAMPRT、NMNAT-1、及び NMNAT-2 から成る群より選択されるタンパク質の活性又は発現レベルを増すことによって、達成することができる。

10

【 0 0 2 4 】

さらに本発明は、細胞の寿命又はそのストレス耐性を調節する化合物を特定する方法を提供する。本方法は、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NAMPRT、NMNAT-1、及び NMNAT-2 から成る群より選択されるタンパク質を、検査化合物に、当該タンパク質の活性に影響するのに充分であろう時間、接触させるステップと、(i i) 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で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ストレス耐性を調節する化合物であることを示す、ステップと、を含む。さらに本方法は、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。さらに本方法は、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

【 0 0 2 5 】

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特定する方法を提供する。本方法は、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核酸を、レポータ遺伝子に作動上連結させて含む細胞又はライセートを、検査化合物に、前記転写調節核酸に影響するのに充分であろう時間、接触させるステップと、(i i) 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、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で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を示す、ステップと、を含む。さらに本方法は、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。さらに本方法は、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。

30

【 0 0 2 6 】

さらに、例えば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薬を特定する方法も、ここで提供する。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あるレポータ・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、(i i) 前記細胞を検査作用薬に接触させるステップと、(i i i) 前記検査作用薬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、前記検査作用薬で処理されていない細胞に比較したときの、前記検査作用薬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、前記検査作用薬が細胞内のニコチンアミドのレベルを調節することを示す、ステップと、を含んでもよい。当該細胞は、さらに、DNA結合因子に結合できる融合タンパク質をコードするベクタを、レポータ遺伝子に作動上連結させて含んでもよい。前記融合タンパク質は、例えば Sir2 ファミリー・メンバ及び異種ポリペプチドなど、ニコチンアミド感受性酵素の少なくとも NAD⁺ 結合ポケットを含んでもよい。前記異種ポリ

40

50

ペプチドは、転写因子の転写活性化ドメインであってよい。本方法はさらに、細胞を前記検査化合物に接触させるステップと、細胞の寿命又はその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。

【0027】

さら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特定するコンピュータ支援された方法も入る。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、分子又は分子複合体の一組の構造座標を提供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Sir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提供するステップと、(iii) 前記化学的実体が、前記分子又は分子複合体に結合する又は干渉すると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に結合又は干渉することは、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。前記化学的実体は、ニコチンアミドの類似体であってもよい。Sir2ファミリー・メンバの活性の阻害剤を特定するための別の方法は、(i) 少なくとも前記Cポケットを含むSir2ファミリーのタンパク質を、検査化合物に、前記検査化合物が前記Sir2ファミリーのタンパク質のCポケットに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) タンパク質の活性を判定するステップと、を含み、但しこの場合、前記検査化合物の非存在下に比べたときに、前記検査化合物の存在下で、前記タンパク質の活性が低いことは、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を示す。

10

20

【0028】

加えて、本発明は、対象における細胞死（例えばアポトーシス）に関連する疾患を治療又は防止する方法を提供するものである。本方法は、 NAD^+ 再利用経路を通る流れを増す、あるいは、細胞死に易罹患性の又は罹患性の細胞内のニコチンアミドレベルを減らす、作用薬を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。疾患は慢性でも又は急性でもよく、その中にはアルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中及び心筋梗塞がある。寿命を延ばす又はストレス耐性を増すための本発明の方法は、さらに、例えば美容目的など、老化を減らすためにも用いることができる。該作用薬は、局所又は全身投与することができる。寿命を延ばす又はストレス耐性を増す方法は、例えば移植前の臓器又は組織など、対象にとって外部の細胞、組織又は臓器に用いることもできる。

30

【0029】

さらに本発明は、細胞の寿命を減らすこと、あるいは、細胞をストレス感受性にすることが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。このような疾患には、例えば癌及び自己免疫疾患など、細胞が望ましくないものである場合が含まれる。

【0030】

さらに本発明の方法は、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ためにも用いることができる。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低下させる化学物質で植物を処理することにより、あるいは、 NAD^+ 再利用経路又は細胞内のニコチンアミドレベルを調節する遺伝子を遺伝子修飾することにより、高い塩、干ばつ又は疾病に対するこれらの耐性を増すことを可能にする。

40

【0031】

発明の詳細な説明

本発明は、酵母細胞の寿命は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD) $^+$ 再利用経路(図1に示す)を通る流れを増すことにより、少なくとも約60%、延長できるという発見に少なくとも基づくものである。加えて、ここでは、 NAD^+ 再利用経路を通る流れのこのような増加は、基本的には NAD^+ 及び NADH レベルの増加なしに、また基本的には、 NAD^+/NADH 定数の比を維持することにより、起きることが示された。実施例で示すように、 NAD^+ 再利用経路を通る流れを増し、またそれにより、細胞の寿命を増すには、例えばNPT1、PNC1、NMA1及びNMA2など、 NAD^+ 再利用経路に関与する遺伝子の付加的なコピーを細

50

胞に導入することにより、可能である。さらに実施例では、 NAD^+ 再利用経路を通る流れを増すと、熱ショックなど特定の種類のストレスから酵母細胞が保護されることも示されている。加えて、PNC1を過剰発現させると、サイレント状態、寿命やストレス耐性が増し、例えば紫外線（U・V・）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損傷から細胞が保護される。他方、PNC1を欠失させると寿命が延び、細胞がストレスに感受性となる。

【0032】

さらに本発明は、ニコチンアミドは酵母においてサイレント状態を阻害し、またそれにより細胞の寿命を減少させるという発見にも、少なくとも基づく。ニコチンアミドは、細胞をストレスに対しより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関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）が過剰発現すると、サイレント状態が刺激され、こうして寿命が延び、ストレス（例えば放射線曝露）への耐性が増したが、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。

10

【0033】

NAD^+ 再利用経路及びサイレント事象が、原核生物から真核生物まで、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、酵母細胞に加え、真核細胞及び原核細胞まで応用可能であると期待される。

【0034】

1. 定義

ここで用いられる以下の用語及び文言は、以下に記載する意味を有するものとする。他にそうでないと明示しない限り、ここで用いられた技術用語及び科学用語はすべて、本発明が属する当業の当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。

20

【0035】

単数形「一つの（原語：a）」、「一つの（原語：an）」及び「その（原語：the）」は、ここでは、文脈が明らかにそうでないと明言しない限り、複数への言及も包含するものである。

【0036】

DNA又はRNAなどの核酸に関してここで用いる場合の用語「単離された」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。ここで用いる場合の単離されたという用語は、さらに、組換えDNA技術により作製された場合には細胞物質、ウィルス物質、又は培地を、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、実質的に含まないような核酸又はペプチドを言う。さらに、「単離された核酸」とは、天然では断片として生じず、また、天然状態では見られないであろう、核酸断片も包含するものと、意図されている。用語「単離された」はまた、ここでは、他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチドを言うために用いられており、精製済み及び組換えのポリペプチドの両者を包含することを意図している。

30

【0037】

「細胞の NAD^+ 再利用経路を通る流れを調節する」とは、例えば図1に示すように、 NAD^+ 再利用経路により生ずる NAD^+ 分子の数を増加又は減少させるような作用を言う。

40

【0038】

ここで用いられる用語「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。この用語は、さらに、均等物として、ヌクレオチド類似体から作製されたRNA又はDNAの類似体や、解説中の実施態様に該当する場合、一本鎖（例えば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、理解されねばならない。EST、染色体、cDNA、mRNA、及びrRNAは、核酸と言及されることのある分子の代表例である。

【0039】

文言「遺伝子に対応する核酸」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、遺伝子を検出するために使用できる核酸を言う。

50

【 0 0 4 0 】

「パーセント、同一」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、比較を目的としてアライメントしてもよい各配列中の一箇所を比較することにより、それぞれ決定することができる。比較された配列中で同等な位置が、同じ塩基又はアミノ酸で占められていた場合、それらの分子はその位置において同一であることになる。同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／又は電子上の性質で類似）で占められている場合、それらの分子を、その位置において相同（類似）であると言及することができる。相同性、類似性又は同一性のパーセンテージによる表現とは、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、多様なアラインメント・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）の一部として入手可能であり、デフォルトを設定する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、米国国立保健研究所、ナショナル・ライブラリ・オブ・メディシン、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を通じて入手可能である。ある実施態様では、2つの配列の同一率は、例えば各アミノ酸のギャップを、それがあたかもこれら2つの配列間の単一のアミノ酸又はヌクレオチドミス対合であるかのように重みを付けて、ギャップ・ウェイトを1にしたGCGプログラムにより決定することができる。アライメントの他の技術は、Methods in

Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USAに解説されている。好ましくは、配列中のギャップを許すアライメント・プログラムを用いて配列をアライメントするとよい。スミス・ウォーターマンは、配列アライメント時にギャップを許す種類のアルゴリズムの一つである。Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997)を参照されたい。さらに、ニードルマン及びワンシュのアライメント法を用いたGAPプログラムを用いても、配列をアライメントすることができる。代替的な検索戦略は、MASPARコンピュータで作動するMPSRCHソフトウェアを用いるものである。MPSRCHはスミス・ウォーターマンのアルゴリズムを用いて配列を超並列コンピュータで採点する。このアプローチは、関係の遠い対合を探し出す能力が高く、特に小さなギャップ及びヌクレオチド配列エラーに寛容である。核酸にコードされたアミノ酸配列を用いると、タンパク質及びDNAの両方のデータベース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Methods in Enzymology, ed. Doolittle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。

【 0 0 4 1 】

ここでは細胞の「寿命」又は「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」が生む娘細胞の数を言う。他方、「暦老化」とは、非分裂細胞の集団が、栄養物質を絶たれたときに生存したまま留まる時間の長さを言う。細胞の寿命は、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、又は20%乃至70%の間、30%乃至60%の間、40及び60%の間、又はそれ以上、本発明の方法により増すことができる。

【 0 0 4 2 】

「Sir2ファミリー・メンバ」又は「Sir2タンパク質ファミリー・メンバ」とは、S・セレビジエSir2タンパク質や、例えばヒト相同体hSIRT1、gSIRT2、hSIRT3、hSIRT4、hSIRT5、hSIRT6及びhSIRT7など、Sir2及びSir-2.1に実質的な構造類似性を有するあらゆるヒストンデアセチラーゼを言う。

【 0 0 4 3 】

「低分子」とは、ここで用いる場合、約5kD未満、そして最も好ましくは約4kD未満の分子量を有する組成物を言うものと、意図されている。低分子は核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチドミメティック、糖、脂質又は他の有機（炭素を含有する）又は無機の分子であってよい。数多くの製薬業が、ここで解説する検定法のいずれかによりスクリーニン

グすることのできる、化学的及び／又は生物学的混合物、しばしば真菌、細菌、又は藻類抽出物の広汎なライブラリを有する。

【 0 0 4 4 】

テンプレート核酸の標的部位に対するプローブの「特異的ハイブリダイゼーション」という用語は、ハイブリダイゼーション・シグナルが明白に解釈できるように、プローブが主に標的にハイブリダイズすることを言う。ここでさらに解説するように、特異的なハイブリダイゼーションが起きるような条件は、相同領域の長さ、該領域のGC含有量、ハイブリッドの融解温度「 T_m 」に応じて様々である。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含有量、酸性度、及び温度に応じて様々である。

10

【 0 0 4 5 】

「ストレス」とは、成長、発生又は生殖にとって至適でないあらゆる条件を言う。

【 0 0 4 6 】

あるポリペプチドの「バリエーション」とは、一つ以上のアミノ酸残基が異なるような、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、「保存的」変更を有していてもよく、この場合置換されたアミノ酸は、類似の構造上又は化学的性質（例えばロイシンのイソロイシンへの置換）を有するものである。バリエーションは、「非保存的」変更（例えばグリシンのトリプトファンへの置換）を有していてもよい。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も含まれよう。生物学的又は免疫学的活性を損なうことなく、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上での指針は、当業で公知のコンピュータ・プログラム、例えばLASERGENEソフトウェア（DNASTAR）を用いて見つけられよう。

20

【 0 0 4 7 】

ポリヌクレオチド配列の文脈で用いられる場合の用語「バリエーション」は、ある特定の遺伝子又はそのコーディング配列のポリヌクレオチド配列に関係するそれを包含するものであろう。この定義には、さらに、例えば「対立遺伝子」、「スプライス」、「種」又は「多型」バリエーションも含まれよう。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だろうが、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が原因で、より多い又は少ない数のポリヌクレオチドを有することだろう。相当するポリペプチドは、付加的な機能ドメインを持っていたり、又は、ドメインを無くしているであろう。種バリエーションとは、一つの種と別の種とで異なるポリヌクレオチド配列である。その結果できるポリペプチドは、一般に、相互に有意なアミノ酸同一性を有しているだろう。多型上のばらつきとは、ある種の個体間で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、ポリヌクレオチド配列が一個の塩基分、異なるような「単一塩基多型」（SNP）も包含するであろう。SNPの存在は、例えばある特定の集団、疾患状態、又は疾患状態への傾向の指標である場合がある。

30

【 0 0 4 8 】

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個乃至約20個の炭素原子を有する。

40

【 0 0 4 9 】

用語「アルキル」は当業で公知であり、直鎖アルキル基、分枝鎖アルキル基、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、飽和脂肪族の基を包含する。いくつかの実施態様では、直鎖又は分枝鎖アルキルは、その主鎖に約30個以下の炭素原子（例えば直鎖の場合は $C_1 - C_{30}$ 、分枝鎖の場合は $C_3 - C_{30}$ ）、そして代替的には約20個以下の炭素原子、を有する。同様に、シクロアルキルは、その環構造内に約3から約10個の炭素原子、そして代替的にはその環構造に約5、6又は7個の炭素を有するものである。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。

【 0 0 5 0 】

50

用語「アラルキル」は当業で公知であり、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。

【0051】

「アルケニル」及び「アルキニル」という用語は当業で公知であり、上に説明したアルキルに対し、長さ及び可能な置換の点で類似であるが、それぞれ少なくとも一個の二重又は三重結合を含むような不飽和脂肪族の基を言う。

【0052】

炭素数を他に特に明示していない場合、「低級アルキル」は、上に定義した通りの、しかし1個から約10個の炭素、代替的には1個から約6個の炭素原子をその主鎖構造に有するようなアルキル基を言う。同様に、「低級アルケニル」及び「低級アルキニル」も同様な鎖の長さを有する。

【0053】

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。

【0054】

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の部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 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「縮合している」）ような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、例えばその他の環はシクロアルキル、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、多環式の系も含まれる。

【0055】

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。

【0056】

「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式であってもよい。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、キサンテン、フェノキサンテン、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、フタラジン、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、スルトン等が含まれる。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。

【0057】

「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、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等といった上述したような置換基で置換されていてもよい。

10

【0058】

ここで用いられる「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。

【0059】

「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、「スルフヒドリル」という用語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、コットン及びウィルキンソンによる「Advanced Inorganic Chemistry」の560に記載された定義を有する。

20

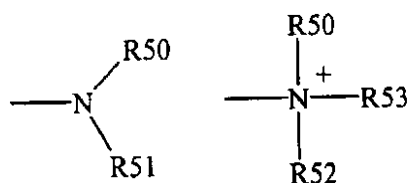
【0060】

「アミン」及び「アミノ」という用語は、当業で公知であり、置換されていない及び置換されたアミンの両方を言い、例えば、一般式：

【0061】

【化1】

30



【0062】

（但し式中、 $R50$ 、 $R51$ 及び $R52$ はそれぞれ個別に一個の水素、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原子と一緒に捉えたと、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、 $R61$ 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である。いくつかの実施態様では、 $R50$ 又は $R51$ の一方のみが、一個のカルボニルであってもよく、例えば $R50$ 、 $R51$ 及びこの窒素が一緒になって一個のイミドを形成していない。他の実施態様では、 $R50$ 及び $R51$ （及び選択に応じて $R52$ ）はそれぞれ個別に一個の水素、一個のアルキル、一個のアルケニル、又は $-(CH_2)_m-R61$ を表す。このように、「アルキルアミン」という用語は、置換された又は置換されていない一個のアルキルをそれに結合させて有する、上に定義した通りの一個のアミン基を意味し、即ち $R50$ 及び $R51$ の少なくとも一方は一個のアルキル基である。

40

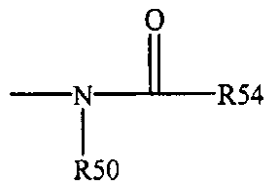
50

【 0 0 6 3 】

用語「アシルアミノ」は当業で公知であり、一般式：

【 0 0 6 4 】

【 化 2 】



【 0 0 6 5 】

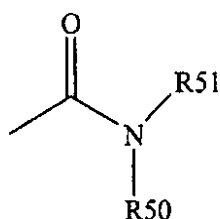
(但し式中、R 5 0 は上に定義した通りであり、そして R 5 4 は一個の水素、一個のアルキル、一個のアルケニル、又は、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{R}61$ (但し式中、m 及び R 6 1 は上に定義した通りである)を表す)で表すことのできる部分を言う。

【 0 0 6 6 】

「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認識されており、一般式：

【 0 0 6 7 】

【 化 3 】



【 0 0 6 8 】

(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包含する。本発明においてアミドのいくつかの実施例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。

【 0 0 6 9 】

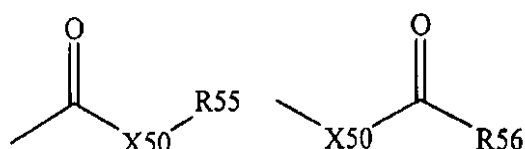
「アルキルチオ」という用語は、それに硫黄ラジカルを結合させて有した、上に定義した通りのアルキル基を言う。好適な実施例では、「アルキルチオ」部分は、 $-\text{S}-$ アルキル、 $-\text{S}-$ アルケニル、 $-\text{S}-$ アルキニル、及び $-\text{S}-(\text{CH}_2)_m-\text{R}8$ (但し式中、m 及び R 8 は上に定義したとおりである)のうちの一つで表される。代表的なアルキルチオ基には、メチルチオ、エチルチオ等がある。

【 0 0 7 0 】

「カルボニル」という用語は当業で公知であり、一般式：

【 0 0 7 1 】

【 化 4 】



【 0 0 7 2 】

(但し式中、X 5 0 は一個の結合であるか、又は一個の酸素又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、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{R}61$ 、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 $-(\text{CH}_2)_m-\text{R}61$ (但しこの式中、m 及び R 6 1 は上に定義したとおりである)を表す)で表すことのできるような部分を含むものである。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

10

20

30

40

50

」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」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。X 5 0 が一個の硫黄であり、R 5 6 が水素である場合、この式は「チオールギ酸」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。

10

【0073】

「アルコキシル」又は「アルコキシ」という用語は当業で公知であり、一個の酸素ラジカルをそれに結合させて有する、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-(CH₂)_m-R₆₁（但し式中、m及びR₆₁は上に説明した通りである）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。

20

【0074】

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とは独立であることが意図されている。

【0075】

トリフルル、トシル、メシル、及びノナフル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。

30

【0076】

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・アブリビエーションズという標題の表で提供されている。

【0077】

本発明の組成物に含まれたいくつかの化合物は、特定の幾何学的もしくは立体異性学的形状で存在していてもよい。加えて、本発明のポリマ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、及び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、考える。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ものと、意図されている。

40

【0078】

例えば、本発明のある化合物の特定のエナンチオマーを欲しい場合、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ーを得る。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

50

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ーで分離した後、純粋なエナンチオマーを回収してもよい。

【0079】

「置換」又は「で置換された」には、このような置換が、置換された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、又は他の反応などの変換を自発的には行わない化合物など、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。

【0080】

「置換された」という用語は、さらに、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、枝分かれ式及び非枝分かれ式、炭素環式及びヘテロ環式、芳香族及び非芳香族の基が含まれる。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、適した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とは意図されていない。

【0081】

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・フィジックス、第67版、1986-87、表紙内側のCASバージョンの元素周期表に基づいて表されている。さらに本発明の目的のために、「炭化水素」という用語は少なくとも一つ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含むものとして考察されている。広い態様では、この許容可能な炭化水素には、非環式及び環式、枝分かれ式及び非枝分かれ式、炭素環式及びヘテロ環式、芳香族及び非芳香族の、置換されていても、又は置換されていなくともよい有機化合物が含まれる。

【0082】

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、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とは独立であることが意図されている。

【0083】

「薬学的に許容可能な塩類」という用語は当業で公知であり、本発明の組成物中に含まれたものなどを含め、比較的に非毒性の無機及び有機酸添加塩類を言う。

【0084】

「薬学的に許容可能な担体」という用語は当業で公知であり、当該組成物又はその成分を身体の一臓器又は一部分から、身体別の臓器又は一部分に運ぶ又は輸送することに関する、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の薬学的に許容可能な材料、組成物又は賦形剤を言う。各担体は、当該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で「許容可能」でなければならない。薬学的に許容可能な担体として役立てることのできる材料のいくつかの例には、(1)ラクトース、グルコース及びスクロースなどの糖類、(2)コーンスターチ及びいもでんぷんなどのでんぷん、(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、セルロース及びその誘導体、(4)粉末トラガcant、(5)麦芽、(6)ゼラチン、(7)タルク、(8)ココアバター及び座薬用うる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脂類、(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ル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)無発熱源水、(17)等張性生理食塩水、(18)リンガー液、(19)エチルアルコール、(20)リン酸緩衝液、及び(21)薬剤調合に用いられるその他の非

10

20

30

40

50

毒性の適合性物質、が含まれる。

【0085】

「全身投与」、「全身的に投与する」、「末梢投与」及び「末梢的に投与する」という用語は当業で公知であり、患者の全身に入り、従って代謝及びその他の同様なプロセスを受けるような、例えば皮下投与など、中枢神経系に直接投与する以外の方法で当該の組成物、治療薬又は他の他の材料を投与することを言う。

【0086】

用語「非経口投与」及び「非経口的に投与する」は当業で公知であり、多くの場合注射による、腸内及び局所投与以外の投与形態を言い、限定的な意味はないが、その中には、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、髄腔内及び胸骨内注射及び輸注が含まれる。

10

【0087】

2. 細胞の寿命を増す、又は、特定のストレスからそれを保護するための方法

ある実施態様では、NAD⁺ 再利用経路を通る流れを増すことにより、細胞の寿命を増す、及び/又は、細胞を特定のストレスから保護する。これは、例えば、NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2から成る群より選択されるタンパク質など、NAD⁺ 再利用経路に関与する少なくとも1つのタンパク質のレベル又は活性を増すことにより、達成することができる。

【0088】

タンパク質のレベルは、例えば、当該タンパク質の細胞内での発現を命令する転写調節配列に作動的に連結された、当該タンパク質をコードする核酸を細胞内に導入することにより、この細胞内で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、そのための適した転写調節配列は当業で公知である。代替的には、タンパク質を、通常はリポソームなどの細胞内への当該タンパク質の進入を容易にするベクタの存在下で、細胞内に導入することができる。さらにタンパク質を、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。さらに他の方法では、内因性遺伝子の発現を刺激する作用薬を細胞に接触させる。このような作用薬は、ここでさらに解説するように同定することができる。

20

【0089】

S. セレビジエのニコチン酸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や、それにコードされたタンパク質を、それぞれ配列番号1及び2に記載する。NPT1はまた「LSR2」としても知られる。S. セレビジエのNPT1の完全cDNAと、コードされたタンパク質はそれぞれ配列番号1及び2に記載されている通りに、GenBank登録番号NC_001147 及びAAB59317に提供されている。登録番号L11274 及びAAB59317はまた、それぞれS. セレビジエのヌクレオチド及びアミノ酸配列にも言及しているようである。細菌でのNPT1相同体はPncB (35、37及び38) である。E. coliのNPT1はGenBank登録番号J05568として提供されている。そのヒトヌクレオチド及びアミノ酸配列は、それぞれGenBank登録番号BC006284 及びAAH06284、並びにそれぞれX71355 及びCAA50490、AAH32466 及びBC032466 に提供されており、Chong et al. (1993)

30

Genomics 18:355に解説されている。該ヒトヌクレオチド及びアミノ酸配列を、それぞれ配列番号13及び14にも記載しておく(並びにGenBank登録番号BC032466に相当する)

。該ヒトタンパク質は、さらに、「腎リン酸ナトリウム輸送タンパク質」とも言及されている。マウスNPT1ヌクレオチド及びアミノ酸配列は、GenBank登録番号X77241 及びCAA54459に提供されており、Chong et al. (1995)

40

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登録番号AF361762として提供されており、Soumounou et al. (2001)

Am J. Physiol. 281: F1082に解説されている。NPT1はまた、番号3957135でイメージ(原語: IMAGE)クローンとしても記載されている。NPT1相同体のアライメントを図15に示す。

【0090】

S. セレビジエのPNC1をコードするヌクレオチド配列と、それにコードされたタンパク質は、それぞれ配列番号3及び4に記載されているが、それぞれGenBank登録番号NC_00

50

1139 及びNP__011478に相当する。PNC1は、細菌タンパク質pncAの酵母相同体であり、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。S. セレビジエのPNC1は、解法読み取り枠 (ORF) YGL037とも言及され、Ghislain et al. (2002) Yeast 19:215に解説されている。ナンキンマメ (Arachis hypogaea) PNC1のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、GenBank登録番号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。ヒト相同体のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、それぞれGenBank登録番号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。ヒトPNC1のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 15 及び 16 に挙げ 10
てあるが、GenBank登録番号BC017344に相当する。ヒト、ハエ及びS. セレビジエのPNC1のアライメントを図 16 に示す。

【 0 0 9 1 】

S. セレビジエNMA1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タンパク質は、それぞれGenBank 登録番号 NC__001144.2 及びNP__013432に相当する、それぞれ配列番号 5 及び 6 に記載されている。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. セレビジエ相同体である。ヒト相同体のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、それぞれGenBank 登録番号NM__022787 及びNP__073624; それぞれAK026065及びBAB15345; それ 20
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、並びに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、それぞれ配列番号 17 及び 18 に記載されており、GenBank 登録番号 NM__022787に相当する。イメージ (原語: IMAGE) クローンは、番号4874147及びHRCクローンhrc08458に提供されている。細菌相同体は、例えばZhang et al. (2002) Structure 10:69に解説されている。

【 0 0 9 2 】

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タンパク質は、それぞれGenBank 登録番号NC__001139及びNP__011524に相当する、それぞれ配列番号 7 及び 8 に記載されている。S. セレビジエNMA2は、Emanuelli et al. (1999) FEBS Lett. 455:13に解説されたORF YGR010に相当する。NMA2は、細菌NaMNAT遺伝子のS. セレビジエ相同体である。ヒト相同体のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、それぞれGenBank 登録番号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は、それぞれ配列番号 19 及び 20 に記載されており、GenBank 登録番号 NM__015039に相当する。 30

【 0 0 9 3 】

完全長タンパク質や、このような完全長タンパク質又はその一部分をコードする核酸を、ここで解説された本方法に従って使用できることは、当業者には明白であろう。タンパク質の一部分は、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うと共に、特定のタンパク質の活性を観察できる検定法を用いて、特定することができる。NPT1タンパク質の活性を判定するための検定法は、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タンパク質の活性を判定するための検定法は、例えばGhislain et al. Yeast 19:215に解説されている。NMA1及びNMA2タンパク質の活性を判定するための検定法は、例えば上記のSestini et al.に解説されている。代替的には、このようなタンパク質の活性を、細胞の寿命が判定されるような検定法で検査することができる。例えば、細胞に、NP 40
T1、PNC1、NMA1又はNMA2タンパク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、又は、コントロール核酸、をトランスフェクトし、該細胞の寿命を比較する。前記タンパク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の方が長いことは、前記タンパク質の当該部分が、生物学的に活性な部分であることの指標である。細胞の寿命を判定するための検定法は当業で公知であるが、ここでもさらに解説されている。具体的には、哺乳動物細胞の寿命を判定するための検定法は、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、あるタンパク質のある部分が生物学的に活性な部分であるかを判断するために、熱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るが、ここでもさらに解説されている。具体的には、哺乳動物細胞の、熱ショックに対する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。

【0094】

NPT1、PNC1、NMA1又はNMA2 タンパク質の部分に加え、一つ以上のアミノ酸の欠失、挿入又は追加を含有するタンパク質など、他のパリアントも、そのタンパク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。アミノ酸の変化の例には、保存的アミノ酸置換がある。他の変化には、非天然で生ずる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、高い又は中程度のハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸にコードされていると共に、生物学的に活性であるタンパク質も使用することができる。例えば、NPT1、PNC1、NMA1又はNMA2をコードする遺伝子に、65 の0.2乃至1× SSCというストリンジェンシーの高い条件でハイブリダイズし、その後65

の0.2× SSCで洗浄される核酸を用いることができる。NPT1、PNC1、NMA1又はNMA2をコードする遺伝子に、室温の6× SSCというストリンジェンシーの低い条件下でハイブリダイズし、その後室温の2× SSCで洗浄される核酸を用いることもできる。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 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ト度をさらに高める、例えば10%、20%、30%、40%又は50%など、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、また、Tijssen (1993) Laboratory

Techniques in biochemistry and molecular biology-hybridization with nucleic acid probesの例えば第1部第2章“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” Elsevier, New

York は、核酸ハイブリダイゼーションに対する基本的な指針を提供するものである。

【0095】

例としてのタンパク質は、少なくとも約50%、70%、80%、90%、好ましくは少なくとも約95%、さら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 タンパク質あるいはそのドメイン、例えば触媒ドメイン、に対して有するものであってもよい。他の例としてのタンパク質は、例えばここに解説されたものなど、野生型NPT1、PNC1、NMA1又はNMA2核酸に対して少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%、さら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核酸にコードされたものであってもよい。

【0096】

他の実施態様では、タンパク質は、例えば経細胞輸送ペプチドに融合したタンパク質など、融合タンパク質である。さらに融合タンパク質は、当該タンパク質の精製及び/又は検出に使用できる異種ペプチドを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0097】

他の実施態様では、非天然で生じるタンパク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よい。

【0098】

さら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つ以上のタンパク質の活性を向上又は増加させる。これは例えば、これらのタンパク質の一つの、酵素活性などの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特定するための検定法については、ここでさらに解説されている。

【0099】

好適な実施態様では、NAD⁺再利用率経路を通る流れを、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のレベルや、これら2つの分子間の比は、例えば実施例で解説する通りに、判定することができる。

【0100】

ポリヌクレオチドを哺乳動物、ヒト又は非ヒトへ、あるいはこれらの細胞へ導入するためのいずれの手段も、本発明の多様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てよい。本発明のある実施態様では、DNAコンストラクトを、トランスフェクションにより細胞に送達、即ち「裸の」DNAで送達するか、又は、コロイド状分散系との複合体に入れて細胞に送達する。コロイド状の系には、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、並びに、水中油乳濁液、ミセル、混合ミセル、及びリポ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の系は、脂質と複合体形成した、又は、リポソームで調合された、DNAである。前者のアプローチでは、脂質などを用いたDNAの調合前に、まず所望の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、発現に向けて実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て、不要な配列を削除するなど）（Felgner, et al., Ann NY Acad Sci 126-139, 1995）。次に、多様な脂質又はリポソーム物質を用いたDNAの調合を、公知の方法及び材料を用いて行い、レシピエント哺乳動物に送達する。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 及びカーソンらによる米国特許第5,679,647号を参照されたい。

【0101】

リポソームのターゲティングを、解剖学的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、例えば器官特異的、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。機械的ターゲティングは、それが受動的であるか、又は、能動的であるかに基づき、区別することができる。受動的なターゲティングは、リポソームが、洞様毛細血管を含む、器官内の細網内皮細胞（RES）の細胞に分散するという天然の傾向を利用する。他方、能動的ターゲティングは、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、又はタンパク質などの特異的リガンドにリポソームを結合させたり、あるいは、天然で起きる局在部位以外の器官及び細胞種へのターゲティングを成功させるために、リポソームの組成又は大きさを変えることによる、リポソームの変更に関する。

【0102】

標的決定される送達系の表面を、多種の方法で修飾してもよい。リポソーム性の標的決定された送達系の場合、ターゲティング・リガンドが、リポソーム二重層との安定な結合を維持できるように、脂質の基をリポソームの脂質二重層に導入することができる。多種の連結基を用いて、脂質の鎖をターゲティング・リガンドに結び付けることができる。裸のDNAや、又は、リポ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）。

【0103】

本発明の好適な方法では、DNAコンストラクトをウィルス・ベクタを用いて送達する。導入遺伝子は、遺伝子治療で有用な多種のウィルスベクタ、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)、及び単純疱疹ウィルス - 1 など、のいずれに導入しても、あるいは、組換え細菌又は真核細胞プラスミドに導入してもよい。多種のウィルスベクタを本発明の実施に用いてよいが、AAV-及びアデノウィルスをベースにしたアプローチが特に有利である。このようなベクタは、外因性遺伝子を *in vivo* で、特にヒトに輸送させるために選択される組換え遺伝子送達系であると、広く理解されている。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は、現場の医師にとって助けとなるであろう。以下に詳述するように、本発明コンストラクトのこのような実施態様は、多種の *in vivo* 及び *ex vivo* の遺伝子治療プロトコルでの使用に向け、特に考察されたところである。 10

【0104】

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利用するものである。36 kBの直線状の二本鎖DNAウィルスであるアデノウィルスの遺伝子構造の知見により、アデノウィルスDNA中の大きな断片を、最大8 kBの外來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、アデノウィルスDNAを宿主細胞内に感染させても、染色体への組込みは起きない。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として複製することができるからである。さらに、アデノウィルスは構造上安定であり、また、広汎な増幅後でも、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、ほぼ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。これまでのところ、アデノウィルス感染は、例えばヒトの急性呼吸器疾患など、関係があるのは軽度の疾患のみであるようである。 20

【0105】

アデノウィルスは、そのゲノムが中程度の大きさであること、操作が簡便であること、高力価であること、標的細胞範囲が広いこと、及び感染性が高いこと、のために、遺伝子輸送ベクタとしての使用に特に適している。このウィルス粒子は比較的安定であり、精製及び濃縮に適合しており、そして上述したように、感染範囲を制限するために修飾することもできる。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 乃至 10^{11} プラーク形成単位 (PFU) /ml など、高力価で得ることができ、またこれらは感染性が高い。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はない。アデノウィルス・ベクタにより送達される外來遺伝子はエピソーム性であるため、宿主細胞への遺伝毒性が低い。野生型アデノウィルスのワクチン接種研究では、副作用が報告されたことはなく (Couch et al., 1963; Top et al., 1971)、*in vivo* 遺伝子輸送ベクタとしての安全性や、治療上の可能性が実証されている。さらに、外來DNAを運ぶアデノウィルスゲノムの能力は、他の遺伝子送達ベクタに比較して大きい (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、従って本発明で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させてあるが、アデノウィルス遺伝物質の 80 % もが残されたものである (例えば Jones et al., (1979) Cell 16:683; 上記の 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)。本発明の挿入されたポリヌクレオチドの発現を、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たプロモータ配列の制御下に置くことができる。 30 40

【0106】

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いるが、正常な溶解による 50

ウィルス生命周期での複製能という点で不活性化させてあるように、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は当業者に公知である。組換えアデノウィルスは、非分裂細胞に感染できず、また気道上皮（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、幅広い細胞種を感染させるために用いることができるために、特定の状況で有利な場合がある。

10

【0107】

さらにアデノウィルスは細胞種特異的にすることができ、即ち、限られた種類の細胞しか感染せず、及び/又は、制限された種類の細胞でしか、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、このウィルスは、1997年12月16日に発行されたヘンダーソン氏及びシュアー氏による米国特許第5,698,443号に解説されているように、標的宿主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ある遺伝子を含む。このように、複製コンピテントアデノウィルスは、E1A又はE1Bなど、複製に必要なタンパク質の合成を調節するための細胞特異的応答配列を挿入するなどにより、特定の細胞に制限

20

【0108】

数多くのアデノウィルスタイプのDNA配列がGenbankから入手可能である。例えば、ヒトアデノウィルスタイプ5はGenBank登録番号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・タイプのいずれから也得られよう。多種のアデノウィルス株が、メリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから、又は数多くの商業的及び学術的ソースからの要請により、入手可能である。ここで解説する通りの導入遺伝子は、いずれのアデノウィルスベクタ及び送達プロトコルにも、制限消化、末端のリンカ連結又は充填、及び連結により、導入できよう。

【0109】

アデノウィルス産生細胞株には、例えばカダンらのPCT/US95/15947 (WO 96/18418)；コヴェスディらのPCT/US95/07341 (WO 95/346671)；イムラーらのPCT/FR94/00624 (WO94/28152)；ペロコードットらのPCT/FR94/00851 (WO 95/02697)、ワンらのPCT/US95/14793 (WO96/14061)に解説されているように、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、これらの遺伝子の中の一つ以上を変異又は欠失させてある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。

30

【0110】

本ポリヌクレオチドの送達に有用なさら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、天然で生ずる欠陥ウィルスであり、アデノウィルス又は疱疹ウィルスなどの別のウィルスを、効率的な複製及び増殖生命周期のためのヘルパウィルスとして必要とする（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）。

40

【0111】

AAVは、いずれの疾患の原因とも関連付けられていない。AAVは形質転換性でも、又は腫瘍発生性ウィルスでもない。AAVのヒト細胞系の染色体への組込みは、当該細胞の成長上の性質又は形態学的特徴に、何ら有意な変化も起こさせない。AAVのこれらの性質からも、潜在的に有用なヒト遺伝子治療ベクタとしてのその使用が推奨される。

【0112】

50

AAVはまた、そのDNAを肺上皮細胞などの非分裂細胞に組み込ませることができ、また高頻度で安定な組込みを示す数少ないウィルスの一つでもある（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; and McLaughlin et al., (1989) J. Virol. 62:1963-1973を参照されたい）。300塩基対という小さなAAVを含有するベクタをパッケージし、組み込ませることができる。外因性DNAのためのスペースは、約4.5kbに限られている。Tratschin et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260に解説されたものなどのAAVベクタを、DNAを細胞内に導入するために用いることができる。多種の核酸が、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; and Flotte et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0113】

典型的に用いられているAAVベースの発現ベクタは、制限部位をフランクする145ヌクレオチドAAV反転末端反復配列（ITR）を含有するが、該制限部位は、利用可能な該制限部位を直接用いるか、又は、制限酵素で当該導入遺伝子を切断し、両端を平滑末端にした後、適したDNAリンカを連結し、制限消化し、該ITR間の部位に連結するといった方法により、当該導入遺伝子のサブクローニングに用いることができる。AAVベクタの能力は約4.4kbである（Kotin, R.M., Human Gene Therapy 5:793-801, 1994 and Flotte, et al. J. Biol.Chem. 268:3781-3790, 1993）。

【0114】

AAVストックは、Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822が解説したようにpAAV/Adを用いることで改良したHermonat and Muzyczka (1984) PNAS 81:6466に解説された通りに作製することができる。ウィルスの濃縮及び精製は、AAVベクタのin vivo発現の最初の報告（Flotte, et al. J.Biol. Chem. 268:3781-3790, 1993）で用いられたように、塩化セシウム勾配でのバンディングや、又は、O'Riordan et al., W097/08298に解説されたような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。AAVベクタのin vitroパッケージングのための方法も利用でき、粒子内にパッケージされるDNAの大きさに制限がないという長所がある。（ツオウらの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）。この手法は、無細胞パッケージング抽出物の調製を含む。

【0115】

ハイブリッドアデノウィルス - AAVベクタの代表例は、アデノウィルスの一部分と、プロモータの制御下で所定の導入遺伝子をフランクするAAV由来の5'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・カプシドである。例えばウィルソンらの国際特許出願公報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遺伝子の存在下で導入遺伝子を宿主細胞染色体内へ安定に組み込ませる能力とを特徴とする。このウィルスは、ほとんどすべての細胞種に感染することができ（そのアデノウィルス配列により可能）、宿主細胞ゲノムに、安定で長期に導入遺伝子を組み込ませる（AAV配列により可能）ことができる。

【0116】

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が必要になる最小限の配列量から、アデノウィルス遺伝子をごく選択された部分のみ欠失させたものまで幅広く、またこの欠失させた遺伝子産物は、パッケージング細胞によりハイブリッドウィルスプロセスで提供させることができる

。例えば、ハイブリッドウィルスには、（複製開始点として機能する）アデノウィルスの5'側及び3'側反転末端反復（ITR）配列を含めることができる。使用できるAd5ゲノムの左側末端の配列（5'）配列は、通常のアデノウィルスゲノムの塩基対1から約36まで延び（さらに、マップ単位0-1と言及される）、5'側ITR及びパッケージング/エンハンサドメインを含むものである。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ヌクレオチドの右側末端の3'側ITR配列（アデノウィルスの約35,353塩基対から末端まで、約マップ単位98.4-100と言及される）を含む。

【0117】

ハイブリッドベクタの調製は、ウィルソンらの公開済みのPCT出願W0/96/13598、標題「Hybrid

Adenovirus-AAV Virus and Method of Use Thereof」にさらに詳述されている。本発明の実施にあたっ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技術に関する更なる詳細な指針については、導入遺伝子の導入のための方法や材料、当該導入遺伝子を含有する組換えウィルスの増殖及び精製、並びに細胞及び哺乳動物をトランスフェクトする際のその使用を含め、さらに、ウィルソンらのW0 94/28938、W0 96/13597及びW0 96/26285、並びにそこで引用された文献を参照されたい。

【0118】

レトロウィルスベクタを作製するためには、目的の核酸をウィルスゲノム内に特定のウィルス配列の代わりに挿入することで、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遺伝子は含有するが、LTR及びpsi成分を持たないパッケージング細胞系を作製する（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）導入すると、該psi配列により、当該組換えプラスミドのRNA転写産物をウィルス粒子内にパッケージさせ、その後、培地中に分泌させることができる（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: Plenum Press; 上記のMann et al., 1983

）。次に、該組換えレトロウィルス含有する培地を採集し、選択的には濃縮し、遺伝子輸送に用いる。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、ホスト細胞の分裂が必要である（Paskind et al. (1975)

Virology 67:242）。この局面は、PVRの治療に特に関係する。なぜなら、これらのベクタにより、増殖する細胞の選択的ターゲティングが可能となり、即ち、PVR対象の眼においてこれらは唯一増殖性のものであるため、網膜上皮の細胞の選択的ターゲティングが可能となるからである。

【0119】

レトロウィルスを用いる際の大きな必須事項は、特に細胞集団内で野生型ウィルスが拡がる可能性に関する、それらの使用上の安全性を確実にすることである。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、遺伝子治療を目的とした遺伝子輸送での使用に関してよ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）。このように、レトロウィルスコーディング配列（gag、pol、env）のうちの一部が、転写活性化因子など、本発明のタンパク質をコードする核酸に置換されたことで、当該レトロウィルスが複製欠陥になっているような組換え

10

20

30

40

50

レトロウィルスを作製することができる。その後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の使用を通じ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、*in vitro*又は*in vivo*の細胞をこのようなウィルスに感染させるためのプロトコルは、Current

Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 及び他の標準的な実験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ベクタはpSR MSVtkNeo

(Muller et al. (1991) Mol. Cell Biol. 11:1785 及びpSR MSV(XbaI) (Sawyers et al. (1995) J. Exp. Med. 181:307) 及びその由来株である。例えば、クラックソンらによるPCT/US96/09948に解説されているように、これらのベクタの両方にある固有のBamHI部位は、ベクタをBamHIで消化することで取り除くことができ、Klenowで充填し、再連結すれば、それぞれpSMTN2 及びpSMTX2を生じさせることができる。環境栄養性及び両栄養性レトロウィルス系の両方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。

【 0 1 2 0 】

レンチウィルスを含むレトロウィルスは、多種の遺伝子を、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、骨髄細胞を含む数多くの様々な細胞種に、*in vitro* 及び / 又は *in vivo* で導入するために用いられてきた (例えばFederico (19

99) Curr. Opin. Biotechnol. 10:448; 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W0 89/07136; PCT 出願W0 89/02468 ; PCT出願 W0 89/05345 ; 及びPCT出願 W0 92/07573によるレビューを参照されたい)。

【 0 1 2 1 】

さらに、ウィルス粒子の表面上のウィルスパッケージングタンパク質を修飾することにより、レトロウィルスの感染範囲、ひいてはレトロウィルスベクタの感染範囲を制限することが可能であることが示されている (例えばPCT公報W093/25234、W094/06920、及びW094/11524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の改変のための戦略には：細胞表面抗原に特異的な抗体をウィルスenvタンパク質に結合させる (Roux et al.,

(1989) PNAS USA 86:9079-9083;

Julan et al., (1992) J. Gen Virol 73:3251-3255; and Goud et al., (1983) Virology 163:251-254) ; あるいは細胞表面リガンドをウィルスenvタンパク質に結合させる (Neda et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:14143-14146)方法がある。結合は、タンパク質又は他の多様体との化学的架橋の形 (例えばenvタンパク質をアシアロ糖タンパク質に転化させるラクトースなど) や、融合タンパク質 (例えば一本鎖抗体 / env融合タンパク質) を作製することによってもよい。この技術は、特定の組織種に感染を制限又は方向付けるために有用であるが、環境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。

【 0 1 2 2 】

本発明のポリヌクレオチドを送達するために使用できる他のウィルスベクタ系は、例え

ば単純疱疹ウイルス（1997年5月20日に発行されたウーらの米国特許第5,631,236号、及びニューロベックス社によるWO 00/08191）などの疱疹ウイルス、ワクシニアウイルス（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ウイルスから得られてきた。好適なウイルスには、アルファウイルス、ポックスウイルス、アレナウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス等がある。これらは、多種の哺乳動物細胞にとっていくつかの魅力的な特徴を持つ（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)。

【0123】

例えば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タンパク質など、あるタンパク質の、本タンパク質をコードする核酸などが投与された対象の細胞における発現は、例えばこの患者から細胞試料を得、コントロール試料と比較したときの該試料中のタンパク質のレベルを判定することなどにより、判定することができる。

【0124】

別の実施態様では、タンパク質又はその生物学的に活性なバリエーションを、それが標的細胞に到達し、その細胞膜を透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あるいはこれらの細胞で合成させ、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はヒト細胞、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させることができる。さらにポリペプチドは、例えば網状赤血球ライセート又は麦芽抽出物など、無細胞抽出物中で合成することもできる。タンパク質の精製は、例えばクロマトグラフィ法など、多種の方法で行うことができる（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）。ある実施態様では、本ポリペプチドを、約6個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。こうして、この融合ポリペプチドを、 Ni^{++} カラム上で精製することができる。前記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により、本ペプチドを Ni^{++} カラム上で精製後に前記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入手することができる。

【0125】

ポリペプチドの投与は、それらを上述したようにリポソームと混合することにより、行うことができる。リポソームの表面を、当該リポソームを、所望の生理学的位置に標的決定する分子を加えることで修飾することもできる。

【0126】

ある実施態様では、細胞膜をタンパク質が透過する速度が高められるように、それを修飾する。例えば、本ポリペプチドを、細胞による本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融合させることができる。ある実施態様では、本ペプチドは、例えばin vitroで細胞に急速に取り込まれる部分である、HIVトランスアクチベータ（TAT）タンパク質の残基37-62又は48-60に相当するフラグメントなど、TATの一部で

10

20

30

40

50

ある (Green and

Loewenstein, (1989) Cell 55:1179-1188)。別の実施態様では、前記内部移行ペプチドはドゥロソフィラ-アンテナペディア (原語: *Drosophila antennapedia*) タンパク質又はその相同体を由来とする。このホメオタンパク質アンテナペディアの60個のアミノ酸長のホメオドメインは、生体膜を通して転位し、それが結合した相手の異種ポリペプチドを転位させるのに便利であることが実証されている。このように、経細胞輸送のために、ポリペプチドを、ドゥロソフィラ-アンテナペディアの約アミノ酸42-58から成るペプチド又はそれより短いフラグメントに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; and Perez et al. (1992) J Cell Sci 102:717-722を参照されたい。

10

【0127】

別の実施態様では、ニコチンアミドの細胞内での量を減少させる。これは、例えばNAD + 再利用経路、又は、ニコチンアミドを生成する他の経路の遺伝子の発現を阻害するなどにより、達成することができる。遺伝子の阻害は、例えばここでさらに解説するように、ニコチンアミドを生成するNAD + 再利用経路遺伝子に対してRNAiを行うなどにより、実施することができる。また、ニコチンアミドのde novo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生成するため、この酵素のレベル又は活性を低下させることにより、ニコチンアミドレベルを低下させることができる。細胞内のニコチンアミドレベルはまた、NADを切断してニコチンアミドにするグリコヒドロラーゼ (例えばヒトCD38、好中球などの免疫細胞の表面上で発現する細胞外酵素; gi:4502665 及びGenBank登録番号NP_001766) のレベル又は活性を低下させることでも、減らすことができよう。

20

【0128】

さらに、de novoニコチンアミド合成経路を阻害することでも、ニコチンアミドレベルを下げられよう。この経路に関与する遺伝子には、S. セレピジエの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、例えばPARP-1及びPARPv 並びにタンキラーゼ (原語: tankyrase) を阻害しても、ニコチンアミドレベルを下げることができる。

30

【0129】

また、ニコチンアミド・トランスポータのレベル又は活性を下げて、細胞内に輸入されるニコチンアミドのレベルを下げるができる。例えば酵母では、ニコチン酸はTna1 (ニコチン酸/ニコチンアミドモノヌクレオチド輸送) タンパク質により輸送される。酵母TNA1のヒト相同体は、以下のGenBank登録番号を有する: 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。調節可能な他のヌクレオチドトランスポータには、細菌及びハエのヌクレオチドトランスポータや、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_0689812; 及びgi: 18603939 及びXP_091525。

40

【0130】

代替的には、例えばニコチンアミドメチルトランスフェラーゼとも言及されるニコチンアミド N-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) など、ニコチンアミドを代謝、分解又は阻害する酵素の活性を刺激したり、又はレベルを増加させるなどしても、ニコチンアミドレベルを低下させたり、あるい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、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して、細胞からのニコチンアミドの排出を促進する (さらにCantoni (1951) J.

50

Biol. Chem. 203-216を参照されたい)。このヒト酵素はNNMTと呼ばれ、その完全な配列は、GenBank 登録番号 U08021に、そしてヌクレオチド配列の場合は配列番号 9 に、そしてタンパク質の場合は配列番号 10 に、見ることができる (Aksoy et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:14835)。この酵素の酵母のものはNNT1 (YLR258wとも言及)と言及されている。

【0131】

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さらに別の酵素は、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。

そのヒト遺伝子はさらにプレ-B-細胞コロニ促進因子 (PBEF)とも呼ばれ、その配列はGenBank 登録番号NP__005737; NM__005746; AAH20691; 及びBC020691で入手することができる。ヒトNAMPRT (BC020691)

のヌクレオチド及びアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 11 及び 12 として提供する。酵母及びヒトの細胞では、それぞれNPT1又はそのヒト相同体のレベルを増加させると、ニコチンアミドレベルを下げるができる。

【0132】

ニコチンアミドを代謝し、そしてそれによりニコチンアミドのレベルを例えば下げるなど調節するであろう別の酵素は、ヒト細胞中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)と言及されている。以下のGenBank 登録番号がこのヒト酵素に提供されている: NP__073624; NM__022787; AAL76934; AF459819; 及びNP__073624; AF314163。この遺伝子のバリエーションは、NMNAT-2 (KIAA0479)であり、そのヒト型はGenBank 登録番号NP__055854 及びNM__015039に見ることができる (Raffaelli et al. (2002)

Biochem Biophys Res Commun 297:835)。酵母細胞において、NAD⁺ 再利用経路で均等な酵素はニコチン酸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) (E.C. 2.7.7.1)である。

【0133】

増加させるとニコチンアミドレベルが低下するであろうさらに別の酵素は、リボース-5-ホスフェートを転化してNPT1の基質であるPRPPにす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。以下のGenBank 登録番号: gi:4506127 及びNP__002755 (Prps1); gi:4506129 及びNP__002756 (Prps2); gi:20539448; gi:4506133 及びNP__002758 (Prps 関連タンパク質 2); gi:24418495 及び Q14558 (Prps関連タンパク質 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) を有するいくつかの関連する酵素がある。

【0134】

細胞内のニコチンアミドレベルを下げると、DNA損傷修復が刺激されるなど、他の利点もあるようである。実際、PARP はニコチンアミドにより調節されている (ニコチンアミドはPARPの負の調節をする)。このように、例えばさらにここで解説するように、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、DNAの損傷修復、テロメアの長さの調節、及びヒストン修飾など、数多くの細胞機能に参与しているため、ニコチンアミドレベルを調節すると、これらの活性を調節することになるであろう。例えば細胞内のニコチンアミドレベルを低下させると、PARPの活性が上昇して、細胞のDNA損傷修復機序がさらに亢進するであろう。

【0135】

本発明の方法を哺乳動物細胞及び酵母細胞などの真核細胞に応用することに加え、本方法は、Sir2ファミリー・メンバが植物中にも存在するという事実にも基づき、植物細胞にも応用することができる。従って、本発明は、植物及び植物細胞の寿命を延ばしたり、過剰な塩条件などのストレスに対し植物及び植物細胞をより耐性に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中の、ここで細胞の寿命及び/又はストレス耐性を増すとして解説されたタンパク質に実質的に相同な植物細胞中のタンパク質

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、植物細胞中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のそれらのレベルの調節に関してここで解説されたように、低下させることができる。核酸は当業で公知の方法に従って植物細胞内に導入することができる。

【0136】

例えば、以下は、細胞内のNAD⁺再利用経路を通る流れ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、上述した遺伝子に相同なシロイヌナズナ (*Arabidopsis*

thaliana) 由来の遺伝子である。酵母PNC1の相同体: 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の相同体: gi 2026021

AAM13003.; gi 15234571 NP_195412.1; gi 25054896 AAN71931.1; 及びgi 15227832 NP_179923.1。酵母NMA1/2の相同体: gi 22327861 NP_200392.2 及びgi 9758615

BAB09248.1。酵母NNT1 (YL285W)の相同体; gi 20197178

AAC14529; gi 22325900 NP_565619.2; gi 15219438 NP_177475.1 (腫瘍関連タンパク質); gi 12324311

AA652120.1; gi:22330409 NP_683465; gi:15240506 NP_199767; gi 8778835 AAF79834.1; 及びgi 15231011 NP_188637。ヒトNNMTの相同体: gi 15238203 NP_196623。酵母QNS1 (NAD⁺再利用経路ではNMA1/2の下流の遺伝子)の相同体: gi:15221990 NP_175906。

酵母BNA6の相同体: gi:18379203 NP_565259 及びgi:21555686

AAM63914。

【0137】

本発明の方法は、Sir2ファミリー・メンバがこれらの原核生物にも存在するという事実に基づき、原核生物などの微生物の寿命やストレス耐性を増すためにも用いることができる。

【0138】

3. 細胞の寿命を減らす、又は、特定のストレスに対してそれをより感受性とする方法

ある実施態様では、NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2から成る群より選択されるタンパク質の発現レベル又は活性を細胞内で減少させる。これは、対応する遺伝子の発現を阻害する作用薬を細胞に導入することにより、達成することができる。作用薬は、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、その転写を減少又は阻害するような低分子であってもよい。さらに作用薬は、当該タンパク質の生物学的活性を阻害する化合物であってもよい。さらに作用薬は、アンチセンス分子、三重分子又はsiRNAであってもよい。さらに他の作用薬は、例えばドミナント・ネガティブ変異体、又は、細胞内抗体、又は、当該タンパク質の生物学的活性に干渉する他のタンパク質など、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。方法の例を以下に紹介する。

【0139】

細胞内の遺伝子の発現レベルを減少させる方法の一つは、細胞内に、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導入する方法である。ここで用いられる「アンチセンス」核酸とは、標的RNAのうちで、例えばその翻訳開始領域などの配列特異的 (例えば非poly A) な部分に、コーディング及び/又は非コーディング領域の何らかの配列相補性のために、ハイブリダイズすることのできる核酸を言う。本発明のアンチセンス核酸は、二本鎖又は一本鎖の、RNA又はDNAあるいはその修飾又は誘導体であるオリゴヌクレオチドであってよく、このオリゴヌクレオチドは、細胞に制御可能な態様で直接投与すること、あるいは、標的RNAの翻訳を混乱させるために十分な制御可能な量、導入された外因性の配列を転写させることにより、細胞内で産生させることもできる。

【0140】

好ましくは、アンチセンス核酸は少なくとも6ヌクレオチドであるとよく、そして好ましくは(6乃至約200個のオリゴヌクレオチドの範囲の)オリゴヌクレオチドであるとよい。具体的な局面では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少

10

20

30

40

50

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。該オリゴヌクレオチドはDNAでも、又はRNAでも、あるいはそのキメラ混合物又は誘導体又は修飾された形であっても、一本鎖でも、又は二本鎖でもよい。該オリゴヌクレオチドを、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格で修飾することができる。該オリゴヌクレオチドには、ペプチドなどの他の付属基や、又は、細胞膜を横切った輸送を促す作用薬（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: PCT Publication No. WO 88/09810, published Dec. 15, 1988を参照されたい）、ハイブリダイゼーションで惹起される切断剤（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）を含めてもよい。

10

20

30

【0141】

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。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してよい。例えば、該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-ブロモウラシル、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1つの修飾塩基部分を含んでよい。

【0142】

別の実施態様では、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、キシルロース、及びヘキソースから成る群より選択される少なくとも1つの修飾糖部分を含む。

【0143】

さらに別の実施態様では、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又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1つの修飾リン酸骨格を含む。

【0144】

さらに別の実施態様では、該オリゴヌクレオチドは2'-アノメリックオリゴヌクレオチドである。2'-アノメリックオリゴヌクレオチドは、相補的なRNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成するが、この場合、通常の3'-ユニットとは対照的に、ストランド同士は互いに並行に延びる(Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641)。

40

【0145】

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で惹起される架橋剤輸送剤、ハイブリダイゼーションで惹起される切断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、リジンが末端に来たアミノ酸残基のペプチド骨

50

格に連結させて含むアンチセンス分子又は抗遺伝子作用薬を言う。該末端のリジンは、当該組成物に可溶性をもたらす。PNAは、相補的な一本鎖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ものだが、PEG化してそれらの細胞内での寿命を延ばしてもよい。

【0146】

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対して相補的な配列を含む。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。ここで言う場合の、あるRNAの少なくとも一部分に対して「相補的な」配列とは、当該RNAとハイブリダイズできて安定な二本鎖を形成することができるように十分な相補性を有する配列を意味する。こうして、二本鎖アンチセンス核酸の場合には、二本鎖DNAの一本の鎖を検査しても、あるいは三本鎖形成を検定してもよい。ハイブリダイズ能は、アンチセンス核酸の相補性の程度及び長さの両方に依存するであろう。一般的には、ハイブリダイズする核酸が長いほど、標的RNAに対してより多くの塩基対ミス対合を含有する可能性があり、それでも尚、安定な二本鎖（又は、状況に応じては三本鎖）を形成するであろう。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判定することにより、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、判定することができる。

10

【0147】

次に、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、当該のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、それらが細胞に取り込まれるであろう制御されたレベルで、細胞の成長環境に配置することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの取り込みは、当業で公知の方法を用いて支援することができる。

20

【0148】

ある代替的な実施態様では、本発明のアンチセンス核酸を、外因性配列からの転写により、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るようにそれを *in vivo* に導入することができ、この細胞内でベクタ又はその一部分が転写されると、本発明のアンチセンス核酸（RNA）が生じる。このようなベクタは、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、それが転写されて所望のアンチセンスRNAを生じることができる限り、エピソード性のままでも、あるいは、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技術により、作製することができる。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、ウィルスでも、又は当業で公知の他のものであってもよい。アンチセンスRNAをコードする配列の発現は、目的の細胞で作用することが当業で公知のいずれのプロモータによるものでもよい。このようなプロモータは誘導性でも、あるいは構成的でもよい。最も好ましくは、プロモータは、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドの制御された発現を達成するために、外因性の成分を投与することで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。哺乳動物細胞に利用できる他のプロモータには、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）、ラウス肉腫ウィルスの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。

30

40

【0149】

多種の癌のためのアンチセンス治療が臨床段階にあり、文献で広汎に論じられてきた。リード氏は、腫瘍におけるBcl-2遺伝子を狙ったアンチセンス治療：腫瘍細胞系で遺伝子輸送を媒介としてBcl-2を過剰発現させると、数多くの種類の癌薬に対する抵抗性がもたらされたことをレビューしている（Reed, J.C., N.C.I.

50

(1997) 89:988-990)。rasのアンチセンス阻害剤の臨床開発の可能性は、Cowser, L.M., Anti-Cancer Drug Design (1997) 12:359-371に論じられている。その他にも、重要なアンチセンス・ターゲットには、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 5 0 】

10

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を、リボザイム、又は、リボザイムをコードする核酸を導入することにより、低下させる。mRNA転写産物を触媒作用により切断するようにデザインされたリボザイム分子を細胞に導入するか、又は細胞で発現させるようにしても、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)。良く用いられているリボザイム・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に対しては、基質配列の要件は小さい。ハンマーヘッド・リボザイムのデザインは、Usman et al.,

Current Opin. Struct. Biol. (1996) 6:527-533に開示されている。ウスマン氏はまた、リボザイムの治療的用途も論じている。リボザイムはさらに、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号に解説された通りに調製及び使用することもできる。HIV-1 RNAのリボザイムによる切断は、米国特許第5,144,019号に解説されている。リボザイムを用いてRNAを切断する方法は米国特許第5,116,742号に解説されており、そしてリボザイムの特異性を増す方法は、米国特許第5,225,337号及びKoizumi et 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ザイム断片の調製及び使用も、Koizumi et

30

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ザイム断片の調製及び使用は、Chowrira and

Burke, Nucleic Acids Res. (1992) 20:2835に解説されている。リボザイムはさらに、Dabubendiek and

Kool, Nat. Biotechnol. (1997) 15(3):273-277に解説されているように、ローリング転写 (原語: rolling

transcription) でも作製することができる。

【 0 1 5 1 】

遺伝子発現を減少させる又は阻害する別の方法は、配列特異的mRNA分解を媒介する二本鎖小干渉RNA (siRNA) を導入する方法である。RNA干渉 (RNAi) は、動物及び植物における配列特異的な転写後遺伝子のサイレント状態のプロセスであり、サイレントになる遺伝子に対して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がリボヌクレアーゼIIIにより切断されて21及び22ヌクレオチドのsiRNAが生じる。21-ヌクレオチドのsiRNA二本鎖は、ヒトの胚性腎 (293) 及びHeLa細胞を含め、様々な哺乳動物細胞系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 (Elbashir et al. Nature

40

2001 ;411(6836):494-8)。従って、細胞中の遺伝子の翻訳は、その細胞を、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ヌクレオチドの長さを有する短い二本鎖RNAに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になるヘアピンRNAをコードす

50

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; 及びBrummelkamp et al. (2002) Science 296:550を参照されたい。使用可能なベクタは、例えば OligoEngine 社の名称pSuper RNAi システムTMなど、市販のものを入手可能である。

【0152】

さらに遺伝子発現は、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）に相補的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、身体内の標的細胞中の遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成させることでも、減少させることができる（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; and Maher, L.J., 1992, Bioassays 14(12):807-15を参照されたい）。

【0153】

更なる実施態様では、RNAアプタマ（原語：aptamer）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アプタマは、Tat 及びRev RNA (Good et al., 1997, Gene Therapy 4: 45-54) などのタンパク質の翻訳を特異的に阻害することができる、それらに対する特異的RNAリガンドである。

【0154】

ポリペプチドの生物学的活性を減少させるさらに別の方法は、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・ネガティブ変異ポリペプチドは、この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、その分子をめぐって競合するが、それは生物学的に不活性であるため、当該ポリペプチドの生物学的活性を阻害するであろう。あるタンパク質のドミナント・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、変異ポリペプチドを過剰産生させるとよい。このような効果を有する点変異が作製されている。加えて、多様な長さの様々なポリペプチドを、あるタンパク質の末端に融合させると、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に一般的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。

【0155】

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タンパク質の活性を低下させる。これは、例えば、これらのタンパク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特定するための検定法は、さらにここで解説されている。

【0156】

別の実施態様では、ニコチンアミドか、又は、実質的に同じ生物学的活性を有するそのバリエーションに細胞を接触させることにより、細胞内のNAD⁺再利用率経路を通る流れを減少させる。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、さらにより好ましくは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入手可能である（例えば実施例で提供した供給源を参照されたい）。細胞をニコチンアミドに、所望の効果を果たさせるために十分な時間、接触させる。例えば、細胞を少なくとも約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。さらに細胞をニコチンアミドに継続的に接触させてもよい。

【0157】

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もできる。類似体の例には、抗結核剤として販売されているピラジニアミドがある。類似体は、所望の活性を有するものについて、類似体のコンビナトリアル・ライブラリを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、寿命を測定するための検定法を用いることができる。

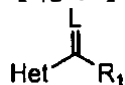
代替的には、ニコチンアミドの類似体や、又は、Sir2ファミリー・メンバーのCポケットと相互作用する作用薬を、さらにここで解説するように、合理的な薬物デザインにより同定することができる。

【0158】

ニコチンアミドの類似体又は誘導体の例には、式I：

【0159】

【化5】



10

【0160】

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-アルキル、-N(R)₂、又は-NH(R)であり；そして

Hetはヘテロアリール又はヘテロシクロアルキルである。

【0161】

使用し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であり、そしてR₁は-NH₂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、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、R₁は-NH₂であり、そしてHetはピリジンである）；並びに式I及び付属の定義の化合物（但し式中、LはOであり、R₁は-NH₂であり、そしてHetはピリジンである）、がある。

20

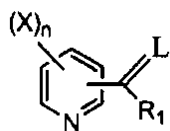
【0162】

使用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：

30

【0163】

【化6】



【0164】

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-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、ハロゲン化物、又はNH₂であり；そして

nは1以上4以下の整数である。

40

【0165】

用いて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、R₁は-NH₂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、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R₁は-NH₂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

50

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）；並びに式ⅠⅠ及び付属の定義の化合物（但し式中、 L は0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。。

【0166】

さらに、ここで解説された化合物の薬学的に許容可能な塩及びプロドラッグを用いてもよい。

【0167】

一般的には、Sir2ファミリー・メンバのいずれの阻害剤も、細胞の寿命を減らすために用いることができる。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・メンバのCポケットに結合する分子である。

10

【0168】

代替的には、細胞の寿命を減らしたり、あるいは、細胞をストレスにより感受性とすることが望ましいような細胞で、ニコチンアミドを産生する酵素のレベル又は活性を増加させることができる。例えば、 NAD^+ 再利用経路中又はde novo合成経路中のニコチンアミドの生合成に関与する酵素のレベル又は活性を増加させることができる。代表的な酵素は前の項で上に記載されている。細胞内のニコチンアミドのレベルを増加させるさらに別の方法には、ニコチンアミドを失活又は分解する酵素、例えば酵母及びヒト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又はそのヒト相同体（やはり上に解説した）、を阻害する方法がある。遺伝子発現レベル又はタンパク質活性を調節する方法は、さらにここ

20

【0169】

さらに他の実施態様では、 NAD を切断し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加させることによって、細胞内のニコチンアミドレベルを増加させることができる。さらに、ニコチンアミド・トランスポータのレベル又は活性を増加させても、細胞内のニコチンアミドのレベルを増すことができる。

【0170】

細胞の寿命又はストレスへのそれらの耐性は、植物細胞や微生物においても、上で解説された遺伝子に相当する植物遺伝子を調節することにより、低下させることができる。これらの遺伝子については、前の項で解説されている。

30

【0171】

4. 細胞内の NAD^+ 再利用経路を通る流れ又はニコチンアミドのレベルを調節する作用薬を特定する方法

作用薬には、低分子、例えば低有機分子、又はいずれかの生物学的巨大分子、一本鎖もしくは二本鎖の、DNAもしくはRNAなどの核酸；タンパク質又はペプチド；多糖；脂質；又はこれらの分子的組合せ、がある。

【0172】

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特定する方法は、(i) NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2から成る群より選択されるタンパク質を検査化合物に、前記タンパク質の活性に影響を与えるのに充分であろう時間、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、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での前記酵素の活性の違いは、前記検査化合物が、細胞の寿命を調節する化合物であることを示す、ステップと、を含む。本方法には、さらに、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、を含めてもよい。代替的には、本方法はさらに、細胞を検査化合物に接触させるステップと、例えば熱ショック、浸透圧ストレス、高温、カロリー制限、DNA損傷作用因子（例えば紫外線及びミトコンドリア変異誘発源臭化エチジウム）、不適切な窒素条件などの特定のストレスに対する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。酵素の活性を判定するステップは、ここでさらに解説するように行うことができる。それにはさらに、細胞の寿命や、

40

50

熱ショック、浸透圧ストレス等に対するその耐性に及ぼされる、検査化合物の影響を測定するステップを含めることもできる。

【0173】

当業者であれば理解されるように、さらに上記の検定法は、上に解説したものなど、上記のタンパク質のうちの一つの生物学的に活性な部分又はバリエーションを用いて行うこともできる。例えば、タンパク質の一部はその触媒部位から構成されたものでもよい。S・セレピジエ及びヒトNPT1の触媒部位は、約アミノ酸209位から240位の間に位置している。S・セレピジエPNC1の触媒部位は、約アミノ酸150乃至186位に位置している。ヒトNMNAT（NMA1及びNMA2の相同体）の触媒部位は、約アミノ酸100乃至110位と、280乃至310位とに位置している（両方の配列とも、活性部位に寄与する）。

10

【0174】

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特定する方法を提供するものである。本方法は、(i) レポート遺伝子に作動的に連結された、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含む細胞又はライセートを、検査化合物に、前記転写調節核酸に影響を与えるのに充分であろう時間、接触させるステップと、(ii) 前記レポート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での前記レポート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を示す、ステップと、を含む。さらに本方法は、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。さらに本方法は、細胞を検査化合物に接触させるステップと、熱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。前記のレポート遺伝子は、その発現を蛍光活性化セル・ソーティングなどにより検出することのできるタンパク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、細胞の完全ライセートでも、又は、それは、細胞ライセートの画分であっても、又は、数種の細胞ライセートの組合せでも、又は、細胞ライセートの画分の組合せであってもよい。ライセートには、さらに、一種以上の組換えタンパク質が含まれていてもよい。

20

30

【0175】

さらに本発明は、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ものである。このような方法は、細胞内のニコチンアミドレベルを増加又は減少させる酵素を調節する作用薬を特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。検定は、基本的には、NAD⁺ 再利用経路を調節する作用薬の特定に関して上述した通りに行うことができる。

【0176】

5. Sir2及びSir2ファミリー・メンバの阻害剤を特定する方法

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。また、ニコチンアミドはSir2のCポケットに結合することにより、Sir2を非競合的に阻害することも示されている。従って、本発明は、合理的な薬物デザインなどに基づいて、Sir2や、Cポケットを含むSir2ファミリーのタンパク質の他のメンバの阻害剤であるニコチンアミドの類似体も特定するための検定法を提供するものである。

40

【0177】

従って、本発明は、特定の細胞の寿命を減らすと有益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使用できる作用薬を特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、Sir2ファミリー・メンバの阻害剤として用いられる作用薬を特定する方法を包含する。Sir2相同体の結晶構造はMin et al. (2001)

50

Cell 105 269に解説されており、その構造はProtein Data Bank

ID code 1ICIに提供されている。CポケットはヒトSIRT1の約アミノ酸70-90位及び127-167位に位置する。Sir2のCポケットは、約アミノ酸250-270位及び310-350位に位置する。当該の座標は、さらに、ニコチンアミド又はその類似体の座標を含んでいてもよい。ある具体的な実施態様では、当該の三次元座標は、Sir2相同体のものである。他の実施態様では、検定法は、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ニコチンアミド類似体などの化合物と同時晶析させるステップを含む。同時晶析は、NAD⁺の存在下であっても、又は非存在下であってもよい。

【0178】

ある実施態様では、潜在的な作用薬は、少なくともCポケットを含むSir2ファミリー・メンバの一部分の三次元座標で合理的な薬物デザインを行うことにより、選択される。上述したように、選択は、コンピュータ・モデリングと連携して行われることが好ましい。こうして、潜在的な作用薬をSir2ファミリー・メンバと接触させ、Sir2ファミリー・メンバの活性を判定する（例えば測定する）。潜在的な作用薬は、Sir2ファミリー・メンバについて判定された活性に減少があるときに、Sir2ファミリーを阻害する作用薬として、特定される。

【0179】

ある好適な実施態様では、本方法は、Cポケットを潜在的な作用薬に結合させて含む、Sir2ファミリー・メンバの少なくとも一部分を含有する補足的結晶を調製するステップをさらに含む。好ましくは、該補足的結晶は、原子座標の決定のために、実質的に5.0オングストロームより良好な分解能に、より好ましくは3.5オングストロームと同等又はそれより良好な分解能に、さらにより好ましくは3.3オングストロームと同等又はそれより良好な分解能に、X線を効果的に回折させるとよい。こうして、補足的結晶の三次元座標は分子置換解析で決定され、第二世代作用薬は、この補足的結晶について決定された三次元座標による合理的な薬物デザインを行うことにより、選択される。好ましくは、この選択をコンピュータ・モデリングと連携して行うとよい。第二世代作用薬はニコチンアミドの類似体であってもよい。

【0180】

容易に明白なはずだが、補足的結晶の三次元構造は、分子置換解析又は多重波長異常分散又は多重同型置換により、決定することができる。こうして、当該の補足的結晶について決定された三次元構造を用いた合理的な薬物デザインを、好ましくはコンピュータ・モデリングと関連させて行うことにより、候補薬物を選択することができる。こうして、候補薬物を、数多くの薬物スクリーニング検定法で、ここに例示した標準的な生化学的方法を用いて、検査することができる。

【0181】

さらに本方法は、第二世代作用薬を、異なる種のSir2ファミリー・メンバ又はその部分に接触させるステップと、前記他の種のSir2ファミリー・メンバ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・メンバで観察されたものに比較して、他の種のSir2ファミリー・メンバの活性に有意に少ない変化（2以上の因数）があったときに、前記第一の種のSir2ファミリー・メンバの基本的な特異的な阻害剤として用いられる作用薬として、潜在的な作用薬が特定される。好ましくは、他の種の活性に全く変化が観察されないか、又は代替的にはごく僅かな（即ち15%未満）変化が観察されるとよい。

【0182】

ある局面では、本発明は、Sir2ファミリー・メンバの活性の阻害剤を特定するための、コンピュータ支援された方法を提供するものである。本方法は、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提供するステップと；ニコチンアミドの類似体などの化学的実体の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提供するステップと；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と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

に結合又は干渉することは、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。好ましくは、前記化学的実体が、当該の分子又は分子複合体に結合又は干渉すると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、前記化学的実体と当該分子又は分子複合体の結合ポケットとの間で嵌合操作を行った後に、該嵌合操作の結果をコンピュータ解析して、前記化学的実体と前記結合ポケットの間の結合を定量するステップを含むとよい。さらに本方法は、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含んでもよい。さらに本方法は、潜在的阻害剤を提供又は合成し、次にこの潜在的阻害剤を検定して、それがSir2ファミリー・メンバの活性を阻害するかどうかを判定するステップを含んでもよい。

【0183】

10

別の局面では、本発明は、Sir2ファミリー・メンバ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・メンバの活性の阻害剤を生成するステップを含み、但し前記化学的実体は、例えば上述したように、コンピュータで支援されたプロセスの間にデザインされたものである。

【0184】

さらに本発明は、Sir2ファミリー・メンバと、ニコチンアミド又はその類似体との間の複合体の表現を含む装置も提供するものである。このような装置の一つは、コンピュータ・メモリ内に該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。本コンピュータは、さらに、前記機械読み取り可能なデータを処理するための指示を記憶するためのワーキングメモリと、前記作業記憶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該複合体の三次元表現にする中央処理装置とを含んでもよい。ある好適な実施態様では、該コンピュータはさらに、前記中央処理装置に接続して前記三次元表現を表示する表示装置を含む。

20

【0185】

6. 発明の用途

ある実施態様では、NAD⁺再利用経路を通る流れを増加させる、又は、ニコチンアミドレベルを減少させるステップを用いて、細胞の寿命を増し、細胞を少なくとも特定の *in vitro*でのストレスから保護する。例えば、培養細胞を、例えばより長時間増殖させるなどのために、ここで解説された通りに処理することができる。これは、培養ではごく限られた寿命しか持たないことが知られている初代細胞培養株（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。例えば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）、及び選択的には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つ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、培養で細胞が生きた状態に維持される時間量が増加するであろう。胚性幹（ES）細胞及び多能細胞や、それらから分化した細胞も、該細胞又はそれらの後代細胞をより長時間培養できるように、本発明の方法に従って改変することができる。細胞の初代培養物、ES細胞、多能細胞及びそれらの後代細胞は、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特定したり、あるいは、細胞に対して化合物の毒性を検査する（即ち細胞毒性検定）ために、用いることができる。

30

40

【0186】

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。当該細胞は、例えば血球、又は組織又は器官などの懸濁液中の細胞であってもよい。例えば、ある個体に投与するために個体から採集された血液を、例えば血球を長時間保存するなどのために、本発明に従って処理することができる。寿命を延ばすため、及び/又は、それらを特定の種類のストレスから保護するために処理してもよい他の細胞には、例えば（肉など）非ヒト哺乳動物由来の細胞など、消費用の細胞や、又は（例えば野菜など）植

50

物細胞がある。

【0187】

別の実施態様では、ヒト又は他の哺乳動物などの対象から得られた細胞を、本発明の方法に従って処理した後、同じ又は異なる対象に投与する。従って、移植片として用いるためにドナーから得られた細胞又は組織を、移植のレシピエントに投与する前に、ここで解説したように処理することができる。例えば、骨髄細胞を対象から得、*ex vivo* で処理してそれらの寿命を延ばし、細胞を特定の種類のストレスから保護してから、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、骨髄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つ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。該移植片は、器官、組織又は疎性細胞であってよい。

10

【0188】

さらに他の実施態様では、細胞を*in vivo* で処理して、それらの寿命を増す、及び/又は、それらを特定の種類のストレスから保護する。例えば、上皮細胞などの皮膚を、ここで解説するように処理することにより、皮膚を皺の発生などの老化から保護することができる。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つ以上の遺伝子の転写を増加させることのできる化合物を含む医薬又は美容組成物に、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タンパク質、あるいは、このようなタンパク質をコードする核酸と、前記核酸又はタンパク質を当該細胞に送達するための賦形剤とを含む組成物に、皮膚細胞を接触させる。

20

【0189】

化合物、核酸及びタンパク質はまた、注射などにより対象の組織又は器官に、細胞の寿命を延ばす、又は、特定のストレスから細胞を保護するために、送達することもできる。

【0190】

さらに別の実施態様では、本発明の作用薬を、例えば概略的にはその細胞の寿命を増し、その細胞を特定の種類のストレスから保護するなどのために、対象に投与する。例えば、作用薬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、このような作用薬は、複合ビタミン剤の成分である。

30

【0191】

細胞の寿命を延ばし、それらをストレスから保護する作用薬は、細胞死に関連する慢性疾患などや、神経細胞死又は筋細胞死に関連する疾患など、細胞死から細胞を保護するためなど、疾患の治療のために対象に投与することもできる。疾患の例にはパーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、羊水栄養性側索硬化症、及び筋ジストロフィがある。このような場合、本作用薬を、細胞死が起きそうな組織又は器官に投与してもよい。

【0192】

このような作用薬を、さらに、例えば脳卒中又は心筋梗塞に罹患した対象や、又は、脊髄損傷を被った対象など、器官又は組織に急性の損傷を被った対象に投与することもできる。作用薬はまた、アルコール性肝臓を修復するためにも使用することができる。

40

【0193】

DNAの修復も、ニコチンアミドによって阻害されるため、細胞内のニコチンアミドレベルを下げる作用薬を用いて、細胞内のDNA修復を促進することができる。従って、例えば紫外線及び臭化エチジウムなど、DNA損傷を惹起しかねない条件に曝される細胞を、それらを、このDNA損傷作用因子への曝露前、曝露中及び/又は曝露後に、細胞内のニコチンアミドレベルを下げる作用薬に接触させることで、保護できよう。

【0194】

他の実施態様では、本発明の方法を酵母細胞に応用する。酵母細胞の寿命を延ばし、それらを特定の種類のストレスから保護することが好ましいであろう状況には、酵母を用いて、例えばビール、ヨーグルトを作製したり、パンを作製する製パンなどの加工がある。

50

寿命の長い酵母を用いると、用いる酵母量を減らせたり、あるいは、酵母をより長時間、活性に保つことができる。

【0195】

さらに本発明は、細胞の寿命を減らしたり、あるいは、熱ショック、放射性活性、浸透圧ストレス、紫外線などによるDNA損傷などの特定のストレスに対してそれをより感受性とする方法も提供する。このような方法は、細胞の寿命を減らすことが好ましい場合なら、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タンパク質のレベル又は活性を下げるステップが含まれる。

【0196】

別の方法は、例えばニコチンアミドに細胞を接触させる、あるいは、例えばNPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NMNAT、NNT1、NAMPRT、及び選択的にNMAT-1又は2のレベル又は活性を減少させるなど、ニコチンアミド生合成を刺激する酵素のレベル又は活性を増加させる、又は、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減少させることにより、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。細胞の寿命を減らしたり、あるいは特定のストレスにそれをより感受性としたいような状況の例には、癌、自己免疫疾患、又は、対象の細胞を消失させることが好ましいような他のいずれかの状況、の治療がある。ニコチンアミド、又は、本発明の他の化合物もしくは作用薬を、腫瘍など、望ましくない細胞を含有する領域に直接投与することができる。さらにこれらの方法は、例えば、ほくろ又は及び線維腫など、非悪性腫瘍の細胞を消失させたり、あるいは望ましくない細胞をそれ以上増殖させないようにするためにも、用いることができる。例えば、ニコチンアミドをいばに注射することができ、あるいは代替的には、いばに塗る医薬組成物中に含めることもできる。

【0197】

細胞の寿命を減らしたり、あるいは、特定のストレスに対するそれらの感受性を増す方法は、酵母感染性対象など、酵母に応用することができる。従って、ニコチンアミドなどの作用薬を含む組成物を、酵母感染の位置に応用することができる。

【0198】

ここで解説するよう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、ヒト以外の霊長類、マウス、及びラットなどの哺乳動物、が含まれる。治療してよい細胞には、真核細胞、例えば上に解説した対象由来のもの、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。

【0199】

7. 医薬組成物及び方法

化合物、核酸、タンパク質、細胞及び他の組成物を、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、タンパク質をコードする核酸、又は、アンチセンス分子は、ウィルスベクターを用いるなどして、上に解説した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、付随する方法を伴ってもよい、対象に移植片を投与する方法に従って、投与することができる。医学的処方の一般的原則については、Cell Therapy:

Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; and Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000を参照されたい。

【0200】

さらに本発明を、以下の実施例により描出するが、以下の実施例を何ら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、公開済み特許出願を含む)全引用文献の内容を、引用をもってここに援用することを明示しておく。

【0201】

10

20

30

40

50

本発明の実施にあたっては、そうでないと明示しない限り、当業の平均的技術水準である、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、及び免疫学の常法を用いることになるであろう。このような技術は、文献に十二分に説明されている。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

【0202】

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

栄養を枯渇させた酵母は、NAD⁺依存性のヒストンデアセチラーゼであるSir2pの活性を必要とする著しい寿命の伸長を示す。そこで我々は、NAD⁺再利用経路にとって重要なニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするNPT1を増量投与すると、Sir2依存性のサイレント状態が増し、そのrDNA遺伝子座が安定化して、酵母の複製寿命が最高60%延びることを示す。NPT1及びSIR2は両者とも、熱ショックに対する耐性を提供するが、このことは、これらの遺伝子が、細胞生存を促進するためにより一般的な態様で作用することを示すものである。我々は、Npt1や、まだ特徴付けられていない再利用経路酵素であるNma2は両者とも、核内に濃縮されていることを示し、かなりの量のNAD⁺がこのオルガネラ内で再生されていることを示唆する。再利用経路遺伝子のPNC1、NMA1及びNMA2のコピーが増すと、テロメア及びrDNAサイレント状態も増すことから、多段階のステップがこの経路の速度に影響を与えていることが分かる。SIR2-依存性のプロセスは付加的なNPT1により高められるが、定常状態NAD⁺レベル及びNAD⁺/NADH比は変化しないままである。この発見から、酵母寿命の延びは、Sir2にとってのNAD⁺利用能が高まると、定常状態レベルが単純に増すことが原因ではないが、促進されるのではないかと思われる。そこで我々は、NAD⁺再利用経路を通る流れの増加が、寿命のSir2依存性の延びを担っているとのモデルを提案する。

30

【0203】

実験の手法

40

プラスミド及び株 - この研究で用いられる株を表2に挙げる。W303AR5 sir3::URA3 (16)、W303AR5 sir4::HIS3、W303AR5 sir2::TRP1 及びPSY316ATが解説されている(41)。PSY316ATでのSIRの欠失を、ScaI/PvuIIで直線化させたpC369を用いて行った(41)。JS209、JS241、JS237 及びJS218はJ. スミス氏から提供された(42)。NPT1のコーディング領域及び1.1kbの上流配列をPCRで増幅し(43)、2.4 kbの産物断片を、pRS306ベースのベクタpSP400のNotI と SacI (M.I.T.大のL. ガランテ氏により提供)の間と、2μベースのベクタpDB20とにサブクローニングして(44)、それぞれpSPNPT1及びpDBNPT1を生じさせた。

【0204】

50

【表 2】

【表 2】

この研究で用いられた酵母株

株	遺伝子型
W303A R5	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ur</i> <i>a3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i>

YDS87 8	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>
YDS92 4	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>
YDS88 2	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>
YDS15 03	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>
YDS15 04	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>
YDS15 05	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>
YDS15 06	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>
YDS14 96	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>pDBNPT1</i>
YDS14 94	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>pDBNPT1</i>
YDS15 87	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>pDBNPT1</i>
YDS14 95	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>pDBNPT1</i>
YDS15 72	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>
YDS15 61	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>
YDS15 95	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>
YDS15 96	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>

10

20

30

40

YDS15 68	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, URA3, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5</i>	
YDS15 63	W303 <i>MATa, ade2-1, LEU2, can1-100, trp1-1, URA3, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5</i>	
YDS15 88	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, pSPYGL037</i>	
YDS15 89	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, pSPYGR010</i>	10
YDS15 90	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, p306YLR328</i>	
YDS16 14	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, p306YHR074</i>	
YDS15 31	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NPT1-HA</i>	
W303c dc25-1 0	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, cdc25-10</i>	20
YDS15 37	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, cdc25-10, NPT1-HA</i>	
YDS16 11	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NPT1-GFP</i>	
YDS16 25	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NMA1-GFP</i>	30
YDS16 24	W303 <i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NMA2-GFP</i>	
PSY31 6AT	<i>MATα, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i>	
YDS15 94	PSY316 <i>MATα, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, sir2:TRP1</i>	
YDS15 44	PSY316 <i>MATα, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, URA3/NPT1</i>	40
YDS15 48	PSY316 <i>MATα, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, (4x)URA3/NPT1</i>	
YDS15 27	PSY316 <i>MATα, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, pDBNPT1</i>	
YDS15 77	PSY316 <i>MATα, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, (4x)URA3/NPT1, LEU2/</i>	

	<i>SIR2</i>	
YDS15 73	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1, 01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i> , <i>sir2::HIS3</i> , <i>URA3/NPT1</i>	
YDS15 91	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1, 01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i> , <i>pSPYGL037</i>	10
YDS15 92	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1, 01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i> , <i>pSPYGR010</i>	
YDS15 93	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1, 01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i> , <i>p306YLR328</i>	
JS209	<i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i>	
JS241	JS209 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>MET15</i>	20
JS237	JS209 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty-MET15</i>	
JS218	JS237 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty-MET15</i> , <i>sir2::HIS3</i>	
YDS15 83	JS237 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty-MET15</i> , <i>LEU2/SIR2</i>	
YDS15 22	JS237 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty-MET15</i> , <i>p2μSIR2</i>	30
YDS15 80	JS237 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty-MET15</i> , <i>npt1Δ::kan^r</i>	
YDS15 81	JS237 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty-MET1</i> , <i>URA3/NPT1</i>	
YDS14 93	JS237 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty-MET15</i> , <i>pDBNPT1</i>	

【 0 2 0 5 】

NPT1 の更なるコピーをURA3 遺伝子座に、StuIで直線化させたプラスミドpSPNPT1を用いて組み込んだ。組込み体をまずPCRで特定した。次に、NPT1 コピー数を、NPT1 及び ACT1 DNAをサザン・プロットでプローブして判定した。NPT1 バンドの濃度を、ACT1 バンドに、ImageQuant ソフトウェア（カリフォルニア州サニーベール、モラキュラー・ダイナミックス社）を用いて比較した。SIR2の付加的なコピーを持つ株を、XcmIで直線化させたプラスミドp306SIR2 又はp305SIR2（17）を組み込むことにより、作製した。高コピーのSIR2を2μベースのプラスミドp2μSIR2（UCSD大、L.ピルス氏より提供）に導入した。それぞれ StuI 及びXcmIで直線化させたpRS306 又はpRS305（45）を組み込むことにより、W303AR5をUra⁺ 及びLeu⁺ 原栄養性に形質転換させた。ADE2消失事象の起きたコロニを選抜することにより、YDS1595をW303AR5から作製した。YDS1595を、StuIで切断されたpRS402（ADE2 遺伝子を持つ）で形質転換させてYDS1596を作製した。W303cdc25

40

50

-10 は S. リン氏 (M.I.T) からの提供だった (19)。NPT1 欠失株である YDS1580 を、この野生型遺伝子を kan^r マーカに、解説された通りに置換することで作製した (46)。PNC1/YGL037 のコーディング領域及び 650bp 上流を PCR によりゲノム DNA から増幅した。1350 bp の SacI/NotI 断片をベクタ pSR400 内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 によりゲノム・テンプレートから増幅し、1730 bp の SacI/NotI 断片を pSP400 内にサブクローニングして pSPYGR010 を作製した。NMA1/YLR328 のコーディング領域及び 450 bp の上流をゲノム・テンプレートから PCR により増幅し、2150 bp の断片を 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 により増幅し、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 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。増幅された全ての DNA に変異がないことを配列決定で確認した。

10

【0206】

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)。緑色蛍光タンパク質 (GFP) カセットを、Npt1、Nma1 及び Nma2 のカルボキシ末端に、解説された通りに導入した (48)。タグ付けされたタンパク質の機能性を rDNA サイレント状態を検定することで確認した。

【0207】

寿命の判定 - 複製寿命の判定を解説された通りに行った (16)。細胞を、他に明示しない限り 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、1 実験当たり最低 40 個の細胞を用いて行った。各実験を少なくとも個別に 2 回、行った。寿命の統計学的有意差は、ウィルコキソンの順位和検定を用いて判定された。差は、信頼度が 95% より高いときに差であるとして記載されている。

20

【0208】

mRNA 及びタンパク質の判定 - ノーザン及びウェスタン・ブロットを常法を用いて行った。NPT1 転写産物を、NPT1 遺伝子の完全開放読み取り枠から得られたプローブを用いて検出した。ACT1 mRNA を完全長 ACT1 プローブ (M. I. T. 大の G. フィンク氏から提供) を用いて検出した。HA エピトープ・タグを、モノクローナル抗体 HA.11 (カリフォルニア州リッチモンド、CRP 社) を用いて検出した。アクチンはモノクローナル抗体 MAB1501R (カリフォルニア州テメキュラ、ケミコン社) で検出された。

30

【0209】

酵母検定及び GFP 位置確認 - 酵母株を他に記載しない限り 30 で成長させた。リボゾーム DNA 遺伝子座でのサイレント状態の程度を、2 つの検定法を用いて判定した。ADE2 のサイレント状態に関する検定では、細胞を合成完全 (SC) 培地 (1.67% 酵母窒素基剤、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、予備成長させた。細胞を SD 培地に再懸濁させ、リン酸緩衝生理食塩水で 10 倍に連続希釈した後、アデニンを欠く SC 培地にスポットした。MET15 のサイレント状態に関する検定は、前に解説した通りに Pb²⁺ 含有プレートで行われた (42)。テロメアのサイレント状態は、0.7 mg/l の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、着色を強めた。熱ショック検定は、基本的には解説された通りに行われた (14)。染色を、ヒスチジンを制限 (20mg/ml) した SC 完全培地上で一晩、予備成長させ、1 × 10⁵ 細胞/ml になるように 3ml の同じ培地で希釈し、5 日間、成長させた。培養物を、換気した培地で 10 倍に希釈し、55 で 1 時間、インキュベートし、SC プレートにスポットした。リボゾーム DNA 組換え率を前に解説された通りに判定した (49)。少なくとも 10,000 個のコロニーを各株毎に調べ、各実験は三重にして行われた。

40

【0210】

NAD⁺ 及び NADH の判定は、他の箇所で解説した通りに測定された (50)。GFP 融合体を発現する細胞を中対数期まで YPD 培地又は YPD 低グルコース (0.5% w/v) で成長させた後に、20 µM の Hoechst 33342

50

DNA株（シグマ社）を含有するPBSで5分間、インキュベートした。画像を100倍の倍率でニコンE600蛍光顕微鏡で撮像し、フォトショップ6.0ソフトウェアを用いて解析した。

【0211】

結果

NPT1を増量投与すると寿命は延びるが定常状態 NAD^+ レベルは上がらない - SIR2は、酵母の寿命の制限要素であり、触媒には NAD^+ を必要とする。E. coliでの研究では、PncBは、 NAD^+ を循環させる再利用経路中の律速段階を触媒する(35、37、38)ことが示された。我々は、酵母 pncB 相同体である NPT1のコピーが付加的にあると、Sir2に対する NAD^+ 産生が増し、ひいては酵母寿命が延びるかどうかを疑問にした。NPT1を、URA3 遺伝子座にその天然プロモータの制御下に置いて組み込んだ。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・プロット法で特定した。我々はその結果得られた遺伝子型をそれぞれ2xNPT1 及び5xNPT1 と言及する。

10

【0212】

複製寿命検定については、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）培地で成長させることで、これらが検定前にカロリー制限条件から確実に十分に回復しているようにした。次に、前に発芽していない母細胞から萌芽した娘細胞を顕微操作して取り出し、採点した。図1Aに示すように、2xNPT1株は、野生型株よりも平均最高40%長く生存し、そして5xNPT1株は、驚くべきことに最高60%、長く生存した。NPT1で誘導された寿命の延びは、sir2を欠失させると完全に失われ、SIR2の付加的なコピーがあっても有意には向上しなかった(図1B)ことから、NPT1によりもたらされた寿命の延びはSir2により媒介されていることが分かる。

20

【0213】

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は、標準的(2%)グルコース培地で成長させたものよりも、有意に長い平均寿命を有することが示されている(19、32)。図1Cに示すように、低グルコース培地上では、5xNPT1株の寿命は、野生型株よりも有意には長くなかった。NPT1 及び低グルコースの影響が相加的でないという事実は、2つの養生法は同じ経路を通じて作用していることを示している。

【0214】

生化学的研究では、Sir2は NAD^+ をコファクタとして要することが示されている。このことから、複製寿命は NAD^+ レベルが上がると延びるのではないかとの仮説が導かれた。この考えと一致するように、 NAD^+ レベルは、老化した細胞では著しく上昇しており、おそらくは、老化に対する防御としてか、あるいは、代謝活性の低下が原因である(50)。今日までのところ、長寿株の NAD^+ の細胞内レベルが報告されたことはない。我々は、2xNPT1株での定常状態 NAD^+ レベル 及び NAD^+/NADH 比は、野生型と有意に異ならないことを見出した(表1)。さらに我々は、Dsir2 及び2xNPT1 Dsir2 株も調べたが、やはり、野生型から何の違いも見出さず、 NAD^+ レベルの増加を検出できなかったことは、Sir2の活性が原因ではないことが分かった。

30

【0215】

【表 1】

表 1. 多種の長寿及び短命株の定常状態 NAD⁺及び NADH レベル

遺伝子型	NAD ⁺ (amol/pg タンパク質) ¹	NADH (amol/pg タンパク質) ¹	NAD ⁺ /NAD H 比	ATP (amol/pg タ ンパク質) ¹
1x <i>NPT1</i> (野生型)	23.7 (3.2)	9.3 (0.8)	2.8 (0.5)	15.5 (3)
2x <i>NPT1</i>	21.9 (2.0)	6.0 (0.6)	3.3 (0.3)	7.6 (1.6)
2x <i>NPT1 sir2::TRP1</i>	22.5 (1.6)	7.0 (0.3)	2.4 (0.9)	5.3 (1.1)
<i>sir2::TRP1</i>	23.6 (1.2)	7.0 (0.6)	2.8 (1.2)	7.9 (1.9)

¹ 5つの個別の実験の平均 (s.e.)

10

【0216】

NPT1 及び SIR2 は熱ショックに対する耐性を増すが他のストレスに対する耐性は増さない - C. エレガンス及びドゥロソフィラのインシュリン / 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 倍も長く生きることができる (5)。C. エレガンスでは、この長寿はストレス耐性に関係している (4)。対照的に、ホモ接合型では最高 50%、寿命が延びるドゥロソフィラでの *chico* 変異は、熱ショックからも、酸化ストレスからも保護しない (51)。C. エレガンスでの *sir2.1* の寿命の延びとストレス耐性との関係が調べられたことはないが、Sir2/3/4 複合体がこのような応答に関与しているのでないかという証拠が酵母で上がっている。酵母 *sir4-42* 変異があると、複製寿命が延びるだけでなく、飢餓及び熱ショックへの耐性も増す (52)。このことから、SIR2 長寿経路がストレス耐性にも影響を与えている可能性が浮かび上がる。

20

【0217】

これを明らかにするために、我々は、NPT1 及び SIR2 のコピーが余分にあると、熱ショック、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曝露を含む多種のストレスに対する耐性がもたらされるかどうかを調べた。MMS は、多種の DNA 病変を引き起こす DNA 損傷物質であり、他方パラコートは、反応性の酸素種を生じることにより酸化ストレスを誘導する。NPT1、SIR2、又は両者のコピーが付加的にあっても、パラコートに対しても、MMS に対しても耐性がもたらされず、また、これらが静止期での生存能を高めることもなかった。

30

【0218】

熱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、SC 培地で静止期まで成長させ、1 時間 55 で熱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 の付加的なコピーを 1 つ持つ株は、他の点で同質遺伝子型の野生型コントロール株よりも、熱ショックに対して、著しく耐性であった。NPT1 及び SIR2 の相加的効果は見られず、これら 2 つ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出すために、株に 1 時間、熱ショックを与え、コロニー個ずつになるようにプレートし、24 時間後のコロニーの数を、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により、野生型の最高 6 倍の生存率が提供され、我々の先の発見と一致した。

40

【0219】

NPT1 が付加的にあると、サイレント状態及び rDNA 安定性が高まる - 我々は、付加的な NPT1 によりもたらされる SIR2 依存的寿命の延びの分子基盤を判定したいと思った。単純なモデルで、NPT1 を増量投与すると、NAD⁺ 再利用経路が刺激され、ひいては Sir2 活性

50

が増すことが予測される。従って我々は、NPT1の付加的なコピーがあったときに、サイレント状態や、rDNA遺伝子座での安定性のSIR2依存的プロセスに対して及ぼされる影響を調べた。

【0220】

NPT1 がrDNAサイレント状態に及ぼす影響を調べるために、我々は、ADE2 又はMET15 マーカをrDNA遺伝子座 (RDN1) に組み込んである株を用いた。我々は、我々が観察した影響が、単にアデニン又はメチオニンの生合成の変化を原因としないことを確認するために、2つのマーカ遺伝子を用いた。ADE2がサイレント状態になると、アデニンを欠く培地上では細胞成長が鈍化し、アデニンを制限したプレート上では赤色の色素が蓄積する。MET15がサイレント状態になると、 Pb^{2+} 含有培地上で茶色の色素が生じる。SIR2の付加的なコピーを持つ株が、比較のために含まれた。2xNPT1株は、ADE2検定 (図3A、アデニン上での成長を、アデニンなしでの成長と比較されたい) 及びMET15検定 (図3B) で野生型よりも高いレベルのrDNAサイレント状態を示した。付加的なNPT1のコピーを2xSIR2株に導入しても、サイレント状態はそれ以上増加せず、やはり、これら2つの遺伝子が同じ経路上にあることと一致した。SIR2 及び NPT1 を高コピー数の2 μ ベースのプラスミド上に持つ株も、高いレベルのrDNAサイレント状態を示した (図3B及びC)。NPT1 の付加的なコピーがあると、sir3 及びsir4 ヌル株でもサイレント状態が増した (図3C)。高コピーのNPT1 はrDNAサイレント状態に対して sir3 株では破壊的效果を有していたが、この効果は、sir4 株では観察されなかった。これは、sir4 変異体がSir2をrDNAに再局在させるという事実で説明でき、これが高レベルのNpt1に対抗するのも知れない。sir2 変異体ではNPT1の付加的なコピーがあることで、SIR2依存的サイレント状態よりも相当に弱いrDNAサイレント状態に僅かな増加が起きた。この見かけの増加の基礎は不明である。これがサイレント状態に対する全体的な影響であるかどうかを判断するために、我々はテロメア遺伝子座でのサイレント状態を調べた。5番染色体のサブテロメア領域にADE2マーカが挿入されたPSY316ATに、NPT1の付加的なコピーを導入した (53)。図3Dに示すように、NPT1 の付加的なコピーがあることで、テロメアのサイレント状態がSIR2依存的な態様で増加した。

【0221】

rDNAの不安定性が、酵母複製老化の主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すことにより寿命を延ばすかどうかを検査するために、我々は、2xNPT1 及び2xSIR2 株でrDNA組換え率を判定した。これは、rDNAに挿入されたADE2マーカの消失率を測定することにより行われた。図3Eに示すように、NPT1 のコピーが付加的にあると、rDNA組換えが、2xSIR2 及び2xNPT1 2xSIR2 株と同様に2分の1に減少した。sir2 を2xNPT1 株から欠失させると、rDNA 組換えは劇的に増加してsir2 ヌル株のレベルになった (図3F)。これらの結果は、NPT1が、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一致している。

【0222】

NPT1のコピーが付加的にあるとrDNAサイレント状態が増す理由を説明する可能な解釈の1つは、これらの株ではテロメアのSir2がrDNAに再局在し、その結果テロメアのサイレント状態が失われるのではないかと、いうものである。我々は、NPT1のコピーが付加的にあると、テロメアのサイレント状態がSIR2依存的な態様で増すことを示し、テロメアからのSir2の再局在が、寿命の延びの機序であるとの説に異論を述べる。もう一つの可能性ある解釈は、付加的なNPT1はSir2の発現を上方調節す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の定常状態レベルは付加的なNPT1にตอบสนองして変化しないことを見出した。rDNAサイレント状態の増加に関する三番目の可能性は、付加的な NPT1 が全体的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で測定することはできないが、この考えは、付加的なNPT1 はこれまで調べられたSIR2依存的プロセスのそれぞれを亢進させるという我々の発見と合致する。

【0223】

カロリー制限はNPT1 発現も局在化も変化させない - 付加的なNPT1及びカロリー制限が

10

20

30

40

50

あると同じ経路を通じて寿命が延びるようであると考えられることから、我々は、カロリー制限がNPT1の発現を増すことにより作用するのかどうかを検査した。3×HA-カナマイシン耐性カセットを天然NPT1遺伝子座に組み込むことにより、三重のヘマグルチニン・エピトープ(3xHA)・タグをNpt1のカルボキシ末端に加えた。我々はこの融合タンパク質が機能的であることを、野生型レベルのrDNAサイレント状態を維持する上でのその能力を検定することにより、確認した。次にNPT1レベルを、(0.5%)グルコース培地上で成長させた株と、カロリー制限の遺伝学的ミミックと考えられる長寿cdc25-10株とで判定した(19)。図4A及びBに示すように、NPT1の発現にはmRNAレベルでも、又はタンパク質レベルでも、増加は検出されなかった。実際、低グルコース条件下では、例外なく最高2分の1の減少がNPT1の発現で観察された。熱ショック又はMMSもしくはパラコートへの曝露後、NPT1発現に有意な変化は検出されなかった(図4C及びD)。そこで我々は、カロリー制限はNPT1発現を上方調節することにより寿命を増すのではないと結論する。

【0224】

NPT1の発現がカロリー制限に応答して高められなかったことから、我々はこのタンパク質の活性が他の手段の調節を受け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存細胞におけるGFPタグ付きNpt1の細胞レベル下局在を調べた。驚いたことに、Npt1は細胞全体に観察され、このタンパク質の明白な濃縮が大半の細胞の核内にあった(図4E)。排除されていた大きな領域は液胞に相当する。これらの発見から、NAD⁺の大部分が核内で再生されているという興味深い可能性が浮かび上がる。低グルコース培地では、Npt1-GFPの局在パターンに変化はなく、カロリー制限に応答したNpt1の相対的再局在化はないことが分かる。

【0225】

全NAD⁺再利用経路が核内の区画に存在すると仮定すると、この経路の他の酵素も、Npt1と同様の局在パターンを示すであろうと予測できる。細菌の再利用経路に基づく、NPT1のすぐ下流のステップは、ニコチン酸モノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ(NaMAT)により触媒されていると予測される。他の種由来のNaMATに類似の相同性を持つ2つの酵母ORF、YLR0328及びYGR010があり、我々はそれぞれをNMA1及びNMA2と名付けた。これら2つのタンパク質の位置確認をするために、GFPカセットを各ORFの停止コドンの前にフレーム内で組み込んで、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のそれと同一のパターンで濃縮していた。さらにこの発見は、NAD⁺は、完全に核内でニコチンアミドから再循環するという我々の仮説を裏付けるものである。Nma1の局在パターンは、発現レベルが低いために判定できなかった。

【0226】

NAD⁺再利用経路中の他の推定寿命遺伝子の同定 - Nma2がNpt1と同様の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も、過剰発現したときにNpt1と同様な効果を有するかどうかを検査した。NAD⁺再利用経路にある細菌遺伝子は詳細に研究されているが、S.セレビジエでは、この経路で鍵となる遺伝子のいくつかは特徴付けが済んでいない。最近同定された遺伝子であるPNC1は、NPT1のすぐ上流のステップである、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ンアミダーゼをコードしている。上に論じたように、2つの遺伝子NMA1及びNMA2が、NPT1のすぐ下流のステップを触媒するNaMAT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⁺の生成は、NADシンセターゼにより触媒されている。特徴付けの済んでいないORFであるQNS1/YHR074はNADシンセターゼに高い相同性を示す。これらの再利用経路の遺伝子のそれぞれが、単一のコピーとしてW303AR5及びPSY316ATのURA3遺伝子座に組み込まれ、前に解説したようにサイレント状態について検定された。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ト状態が増加して、2xNPT1株のそれと同様なレベルになった(図5B及びC)。対照的に、QNS1の付加的なコピーがあっても、rDNA(図5B)のサイレント状態にもテロメアのサイレント状態にも、何の影響もなかった。下に論じるように、これらの結果は、この経路の速度に影響する複数のステップがあること、そして、2つの相同体NMA1及びNMA2が重複する機能を有する可能性があるこ

と、を示唆している。

【0227】

議論

NPT1 は、Sir2のコファクタであるNAD⁺ を再循環させる酵母再利用経路の鍵となる成分をコードしている。我々は、NPT1 の付加的なコピーがあると、寿命が最高60%、SIR2依存的な態様で増すことを示した。酵母の寿命は高いNAD⁺ レベルと関係がある可能性が提案されている。しかしながら、我々は、NPT1 の付加的なコピーを持つ株では、定常状態のNAD⁺ レベルは変化がないことを示した。さらに、NAD⁺ / NADH比も、野生型細胞に同様であることから、全細胞レドックス状態は劇的には変化していないことが分かる。

【0228】

さらに我々は、sir2 変異体は野生型のNAD⁺ レベルを有するため、Sir2はNAD⁺ の主要な消費物質ではないことが分かることを示した。にも係わらず、NAD⁺ をニコチンアミドに転化するその能力があるため、Sir2は再利用経路を通る流れの増加に対して応答性であるはずである(図6)。このように、NAD⁺ の定常状態レベルは一定のままであるが、この分子のターンオーバーが上昇するのかも知れない。GFPで標識された酵素の局在から、NAD⁺ 再利用経路中の酵素のうちの少なくとも2つが、核内に濃縮していることが分かった。これと一致して、Nma1 及びNma2 は、高スループットの2種ハイブリッド・スクリーニング法により、核内局在配列(NLS)の受容体として作用するタンパク質であるSrp1と相互作用することが示されている(54)。同じ2種ハイブリッド・スクリーニングで、Nma1及びNma2はそれら同士の間でも、また相互の間でも相互作用することができるとも見出されている。おそらくNmaタンパク質は、バシラス-サチリス(*Bacillus subtilis*) NaMNAT (55)の場合と同様に二量体として存在するか、メタノコッカス-ジャナスチイ(*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(*Methanobacterium Thermoautotrophicum*) (57) NaMNATの場合と同様に六量体として存在する。NMA1 又はNMA2 のいずれかを破壊した株は生存しており(58)、これらは機能的に重複していることが論じられることに注目されたい。

【0229】

脊椎動物においては、NaMNAT/NMNAT活性は主に、肝細胞抽出物の核画分に観察され(59)、当該経路の核内区画化は、真核細胞全般の性質であろうことが示唆されている。この再利用経路がクロマチンの近傍にあることにより、サイレント状態にするタンパク質のためにNAD⁺ を急速に再生できるのかも知れない。あるいは、核内のNAD⁺ プールを変更することにより、多種の核内活性を調和可能にしているのかも知れない。これらの仮説を検証することは簡単な作業ではないであろうが、細胞内NAD⁺ に関する分子プローブが開発されれば、大きく助けとなるであろう。

【0230】

酵母及び数多くの後生動物では、多くの長命な変異体がストレス耐性の増加を示している。しかしながら、寿命は延ばすがストレスからの保護は小さくなるような変異の例が数多くあり、この関係が単純ではないことを示している(4)。例えば、酵母では、cdc25-10の変異によりもたらされる寿命の延びには、熱ショック耐性は伴わない(19)。我々は、NPT1 又はSIR2 のコピーが付加的にあると寿命は延びるが、MMS、パラコート又は飢餓からの保護は提供しないことを示した。このように、S. セレビジエでは、寿命はストレス耐性の全体的増加には関係していない。寿命に相関すると我々が見出した唯一のストレス関連表現型は熱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、3つのサイレント遺伝子座にあるもの以外の遺伝子を調節していると提案されている(60)が、この解釈は論議を呼んでいる(61)。この解釈が正しいとすると、我々が2xNPT1 及び2xSIR2株で観察した熱ショック耐性は、熱ショック耐性を抑制する遺伝子の、Sir2を媒介としたサイレント状態が原因であると考えるのが妥当である。

10

20

30

40

50

【0231】

細菌では、Npt1相同体PncBは、 NAD^+ 再利用率の律速段階を触媒している(35、37、38)。この研究では、我々は、PNC1、NPT1、NMA1又はNMA2すべての付加的なコピーがrDNA及びテロメアのサイレント状態を増加させることを示す。それが意味するものは、酵母においては複数の段階が経路の速度に影響を与えることができるということである。このような提案は、大半の代謝経路を通る流れは、単一の律速段階ではなく、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)。当該の再利用率経路中のすべての遺伝子の中でも、QNS1だけは、サイレント状態に対して何の影響もなかったことから、それが当該経路中で、基質利用能の制限を受ける唯一の酵素であることが分かる。これはおそらく、デスアミド- NAD^+ であるQns1にとって予測される基質は、この再利用率経路の外の供給源からは供給できない唯一の中間体であるという事実が原因であろう(図6を参照されたい)。

【0232】

酵母及び後生生物では、Sir2ファミリーには複数のメンバがあるが、その多くは、 NAD^+ 依存的デアセチラーゼであることが示されている(又は予測されている)(24、63)。この発見を、いくつかのSir2ファミリー・メンバは細胞質内にある(64、65)という事実と組み合わせると、可逆的なアセチル化が、以前に考えられたよりも遙かにより支配的な調節機序であろうということが分かる(66)。こう考えると、 NAD^+ 再利用率経路は、細胞のエネルギー状態に回答するこのグループのエフェクタタンパク質の活性を調和させる中枢位置に来るであろう。

【0233】

今や、寿命の調節のための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、その生物の寿命が延びるという発見で例示される(31)。我々の発見は、酵母において、いくつかのSIR2依存的プロセスは NAD^+ 再利用率経路を操作することで向上させることができることを示すが、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、我々が調べた全てのゲノムでNPT1相同体を同定したが、そのいずれも、ヒスチジン残基の周りに保存度の高い領域を持ち、この領域は、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ものである(67)。この形態の調節により、Npt1活性を増すような変異又は低分子のデザインが可能であろう。まとめると、我々の発見では、Npt1及び当該再利用率経路の他のメンバは、カロリー制限の有益な効果を模倣するであろう低分子のための魅力的なターゲットであることを示すものである。

【0234】

参考文献

1. Masoro, E. J. (2000) Exp Gerontol 35(3), 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. 10
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. 20
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), 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. 30
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. (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. 40
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* 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., 50

- 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. (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. 10
33. Foster, J. W., Kinney, D. M., 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. Vinitzky, A., Teng, H., and Grubmeyer, C. T. (1991) *J Bacteriol* 173(2), 536-40. 20
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. 30
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. 40
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., Brachat, A., 50

- Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998) *Yeast* 14(10), 953-61.
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., Leever, S. J.,
and Partridge, L. (2001) *Science* 292(5514), 104-6.
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* 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.
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.
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.

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.

10

【 0 2 3 5 】

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促進

サッカロミセス-セレビジエ (Saccharomyces

cerevisiae) Sir2 タンパク質は、転写のサイレント状態、ゲノム安定性及び寿命において重要な役割を果たすNAD⁺ 依存的ヒストンデアセチラーゼである。Sir2のヒト相同体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つの生成物を生じる：0-アセチル-ADP-リボースと、ニコチン酸の前駆体であり、

ナイアシン/ビタミンB3の1つの形であるニコチンアミドである。我々は、ここで、ニコチンアミドは酵母のサイレント状態を完全に損ない、複製寿命をsir2変異体のそれまで縮

20

めることを示す。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サイレント状態を強く阻害するが、ニコチン酸はしない。ニコチンアミドはまた、rDNA遺伝子座の不安定性を高め、酵母の寿命をsir2 変異体のそれまで縮める。さらにニコチンアミド

は、G1期停止細胞でサイレント状態を損なうことから、継続的なSir2 活性がサイレント状態の維持には必要であることが分かる。ニコチンアミドの存在下では、Sir2はもはやテロメアとも、接合型遺伝子座とも結び付かず、rDNAとは結び付いたままである。Sir2は、

ニコチンアミドの存在下では、もはやテロメア及び接合型遺伝子座で、クロマチンと同時に免疫沈降しないが、Sir2局在パターンは変わらない。我々は、in vitroで生理濃度のニコチンアミドがSir2及びSIRT1の両方を阻害することを示す。ニコチンアミド(IC₅₀ < 50 μM)

30

によるSIRT1 の阻害の程度は、このクラスのタンパク質の大半の有効な既知の阻害剤と等しいか、又はより良好である。我々は、ニコチンアミド及びNAD⁺ はSir2に同時に結合して触媒作用を防ぐことができることを提案し、ニコチンアミドによるSir2の阻害は生理学的に適切である可能性を論じる。

【 0 2 3 6 】

我々は、核内ニコチンアミドがin vivoでSir2活性の負の調節をしている可能性を論じる。我々の発見は、ニコチンアミドの臨床上的使用には慎重な配慮をせねばならないと示唆するものである。

【 0 2 3 7 】

実験の手法

酵母検定 - この研究で用いた全ての酵母株を表3に挙げる。細胞は、他に記載しない限り、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ト状態の程度は、RDN1::MET15 株をPb²⁺ 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(NO₃)₂及び2% 寒天)上で成長させることにより判定された。ADE2ベースのテロメア及びHM 遺伝子座のサイレント状態の検定は、前に解説された通りに行われた(実施例1を参照されたい)。リボゾームDNA組換え頻度は前に解説された通り

40

判定された(44')。

【 0 2 3 8 】

【表 3】

この研究で用いられた酵母株

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>
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>
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>
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 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i>
YDS1594	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i> , <i>sir2:TRP1</i>
YDS970	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i> , <i>HMR::GFP</i>
YDS1005	PSY316 <i>MATa</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i> , <i>HMR::GFP</i>
YDS1499	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i> , <i>HMR::GFP</i> , <i>sir4:HIS3</i>
YDS1690	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i> , <i>HMR::GFP</i> , <i>Δhml::LEU2</i>
JS209	<i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i>
JS241	JS209 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>Ty1-MET15</i>
JS237	JS209 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty1-MET15</i>
JS218	JS237 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty1-MET15</i> , <i>sir2::HIS3</i>

10

20

30

40

YDS1583	JS237 <i>MATα</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>met15Δ200</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>ura3-167</i> , <i>RDN1::Ty1-MET15</i> , <i>LEU2/SIR2</i>
---------	---

【 0 2 3 9 】

複製寿命の判定は、解説した通りにマイクロ操作により行われた（ 2 5 ' ）。最小 4 0 個の細胞が 1 回の実験で調べられ、各実験は個別に少なくとも 2 回、行われた。寿命の統計学的有意差は、ウィルコキソンの順位和検定を用いて判定された。差は、信頼度が 9 5 % より高いときに差として記載されている。 10

【 0 2 4 0 】

FACSCalibur フロー・サイトメータ（カリフォルニア州、ベクトン・ディッキンソン社）を解説された（ 4 5 ' ）通りに用いた蛍光活性化セル・ソーティング法（FACS）により GFP 蛍光を定量した。G1期停止実験に際しては、細胞を 10 μ g/ml の 因子で 3 時間、処理した。DNA含有量を、解説された通り（ 4 5 ' ）にヨウ化プロピジウム（シグマ社）で染色された固定細胞のFACS分析により判定した。典型的には 1 試料当たり、20,000個の細胞を分析した。データの獲得及び解析は、CELLQuest ソフトウェア（ベクトン・ディッキンソン社）を用いて行われた。 20

【 0 2 4 1 】

蛍光顕微鏡法及びクロマチン免疫沈降 - GFP 蛍光を、合成培地（SC）（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）で対数期まで成長させた生存細胞で観察した。画像をニコン・エクリプスE600顕微鏡を倍率 1 0 0 0 \times にして用いて撮像し、Scionイメージ・ソフトウェアで解析した。クロマチン免疫沈降法（ChIP）を、解説された通り（ 4 5 ' ）に、表 2 に挙げたプライマ対を用いて行った（ 4 6 ' ）。P C R 反応を予め清澄させた全細胞抽出物由来の入力DNAの 1/5000又は 1/12500希釈液と、免疫沈降させたDNAの 1/50希釈液とを用いた 50 μ l の体積で行わせた。P C R パラメータは以下の通りだった。CUP1 及び 5S rDNAプライマ対の場合、2 6 サイクルの P C R を、5 5 のアニーリング温度で行った。Tel 0.6、Tel 1.4 及び HM プライマ対の場合、5 0 のアニーリング温度での 3 2 サイクルを用いた。P C R 産物を、2.3%アガロース・ゲルによるゲル電気泳動法で分離し、臭化エチジウム染色で観察した。 30

【 0 2 4 2 】

【表 4】

オリゴヌクレオチド配列

オリゴヌクレオチド	配列
TEL-0.6.正方向	CAGGCAGTCCTTTCTATTT C
TEL-0.6.逆方向	GCTTGTTAACTCTCCGACA G

TEL-1.4.正方向	AATGTCTTATCAAGACCGA C
TEL-1.4.逆方向	TACAGTCCAGAAATCGCTC C
RDN-5S.正方向	GAAAGGATTTGCCCGGACA GTTTG
RDN-5S.逆方向	CTTCTTCCCAGTAGCCTGT TCCTT
HMR-YA/ZL.正 方向	GTGGCATTACTCCACTTCA AGTAAG
HMR-YA/ZL.逆 方向	CAAGAGCAAGACGATGGG G
CUP1-正方向	TTTTCCGCTGAACCGTTCC A
CUP1-逆方向	CATTGGCACTCATGACCTT C

10

20

【0243】

In vitro 脱アセチル化検定 - 組換えGSTタグ付き酵母Sir2p (D.モアゼッド氏より提供) 及び組換えヒトSIRT1 (47') を、デアセチラーゼ活性について、HDAC蛍光活性検定 / 薬物発見キット (AK-500、BIOMOLリサーチ・ラボラトリーズ社) を用いて検定した。この検定系により、展開剤で処理したときに出るヒストン基質の脱アセチル化による蛍光シグナルの検出が可能になる。蛍光は、蛍光分析リーダー (Cytofluor II 400 シリーズ、PerSeptive バイオシステムズ社) を励起を360nmに設定し、発光検出を460nmに設定して測定された。反応液を、5 µg の GST-Sir2 又は2.5 µg の SIRT1 のいずれかから構成し、250 µM のアセチル化ヒストン基質、1mM の DTT、及び、解説された通りの一定の範囲の NAD^+ 濃度を50 µl 検定緩衝液に溶かしたものと一緒にインキュベートした。酵母及びヒトタンパク質との反応を、それぞれ30 及び37 で30分間、行わせた。

30

【0244】

阻害剤検定の場合、反応を、200 µM NAD^+ と、ニコチンアミド (0、50、150 又は300 µM) (シグマ社) 又は50 µM の以下の阻害剤；ニコチン酸 (シグマ社)、シルチノール (原語: sirtinol)、M15 (ケンブリッジ大)、スプリトマイシン (47)、TSA (BIOMOL社) のいずれかとの存在下で行わせた。

【0245】

結果

40

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ト状態を損なう。ニコチンアミドはSir2脱アセチル化の生成物であり、 NAD^+ 再利用経路の鍵となる基質である。 NAD^+ 生合成を操作すると、Sir2依存的活性に影響を与えることができるという我々の前の観察に基づき (実施例1を参照されたい)、我々は、どのような効果を NAD^+ 前駆体がサイレント状態に対して有するかを調べたいと考えた。ADE2 又はMET15 マーカをrDNA遺伝子座 (RDN1) に組み込ませた形で持つ株を調べた。ADE2 がサイレント状態になると、アデニンを制限したプレート上では赤色の色素が蓄積するが、MET15 がサイレント状態になると、 Pb^{2+} 含有培地上で茶色の色素が生じる。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生合成の変化の結果ではないことを確認した。SIR2 のコピーを1つ余分に持つ株 (2X SIR2)、又は、SIR2を欠く株 (sir

50

2::TRP1) を、それぞれサイレント状態の増加及びサイレント状態の消失に関する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とき、サイレント状態は完全に失われる。この遺伝子座にある ADE2 マーカのサイレント状態も、ニコチンアミドの添加により同様に失われた。

【0246】

ニコチンアミドの効果が rDNA に特異的なものか、あるいは、それは他の異質染色性領域にも影響するのかを検査するために、我々はテロメアでのサイレント状態を調べた。テロメアのサイレント状態を観察するために、我々は、ADE2 遺伝子が 5 番染色体右腕のサブテロメア (Y') 領域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上では、コロニは、ADE2 マーカのふ入りの発現のために、赤/白の部分をもつ。5 mM ニコチンアミド の存在下では、コロニは白色であり、抑制の完全な消失が実証された (図 8 B)。さらに我々は、接合型遺伝子のサイレント状態も観察し、ニコチンアミドは、この遺伝子座でもサイレント状態を完全に失わせることを見出した。

10

【0247】

NAD⁺ 再利用経路中の中間体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 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 依存的サイレント状態に及ぼす効果を調べたが、いずれの場合でも、ニコチン酸は何の効果も有さないことを見出した。

【0248】

20

ニコチン酸はゲノムの不安定性を高め、酵母寿命を縮める。我々は、上記のサイレント状態の消失が Sir2 活性の阻害が原因であるかどうかを判断したいと考えた。もしそうであれば、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 で処理したところ、sir2 変異体のそれと同様に、マーカ消失の頻度が最高 7 倍まで増加した。重要なことに、sir2 株を処理しても、それ以上組換えは増加せず、観察されたマーカの消失は、Sir2 の阻害が原因であることを示した。

【0249】

30

rDNA 遺伝子座の不安定性は、酵母複製老化の主要な原因であることが示されている (25', 26')。従って我々は、ニコチンアミドが酵母寿命に及ぼす効果を調べた。細胞を 2 日間、新鮮な酵母 YPD 培地上で成長させて、それらが検定前に確実にカロリー制限条件から完全に回復しているようにした。その後、前に萌芽していない母細胞から萌芽した娘細胞をマイクロ操作で取り出し、採点した。図 9 C は、野生型 (三角) 及び短命の sir2 変異体 (丸) の両方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上で成長させた細胞 (塗りつぶしたダイヤモンド) は、野生型のその平均で最高 45 % の寿命を有し、sir2 変異体のそれと同等だった。該 sir2 株をニコチンアミドで処理しても、寿命はそれ以上、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な効果も観察しなかった (図 9 D、それぞれ塗りつぶしたダイヤモンド及び開放したダイヤモンド)。

40

【0250】

ニコチンアミドは非分裂細胞でサイレント状態を阻害する。サイレントなクロマチン・ドメインを再度確立するには、S 期を通過させることが必要 (50') だが、それを惹起するのは 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 複合体が存在することが、細胞周期全体を通じてサイレントな状態を維持するのに必要であることが分かる (50')。我々は、ニコチンアミドが、周期循環中の細胞のサイレント・ドメインを抑制解除して複製寿命を縮めることを示した。我々は、ニコチンアミド処理で、非周期循環中の G1 期停止細胞でもサイレント状態に同様な効果があるかと考えた。我々は、HMR 遺伝子座に GFP レポータを組み込んで含有する

50

株を用いることで、単個細胞におけるHMサイレント状態に対するニコチンアミドの効果を定量することができた。我々はまず、周期循環中の細胞でこの系をバリデートした。図10Aに示すように、GFPは、この遺伝子座でのサイレント状態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 のニコチンアミド中の60分後では、我々は、発現レベルの劇的な増加を観察し、これは90分後ではさらに著明となった(図10A、それぞれ2番目及び3番目のパネル)。

【0251】

サイレント状態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・ソーティング法(FACS)で分析した。図10Bの上側2つのパネルはsir4及び野生型株の異時培養物の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複合体が破壊されて、これらの部位から離れてrDNAへとSir2が再分配された。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すものである。図10Bは、5 mM のニコチンアミド中での野生型細胞の成長が、この遺伝子座の完全な抑制解除(3番目のパネル)へとつながり、sir4変異体とは対照的であることを示す。5 mM のニコチン酸又は構造上関連するキノリン酸(de novo NAD⁺合成経路での基質)で処理された細胞では、GFP発現に何の増加も見られなかった(図10B、下側2つのパネル)ことから、この脱サイレント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。

10

【0252】

この検定系を用いて、我々は、非周期循環細胞におけるニコチンアミドの異種クロマチンに対する効果を観察できた。GFP導入遺伝子を含有するMATa株を、HML遺伝子座について欠失させて、これらの細胞が、a及び 遺伝子の同時発現のために、G1期停止を確実にしないようにした。因子での処理によるG1での停止後、細胞を5 mMのニコチンアミドに曝露し、FACSで30分毎に調べた。図10C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したときに、サイレント状態の消失を見せた。FACSでDNA含有量を測定すると、この実験の間中、細胞がG1期に留まったことが確認できた(図10C、右側コラム)。これらの結果は、外因性ニコチンアミドが、非分裂細胞においてすらサイレントクロマチンを抑制解除することを実証するものであり、異種クロマチンは不安定であり、動的な構造であることを示唆している。またこれは、ヒストンが継続的に脱アセチル化していることが、サイレント状態の維持にとって必須であることも示している。

20

30

【0253】

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、ニコチンアミドが異種クロマチンを3つのサイレントな遺伝子座すべ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最も可能性のある解釈は、Sir2はニコチンアミドにより触媒として失活するというものだが、この説は、Sir2が非局在化する、あるいは、その発現が下方調節される、という説も可能である。後者の可能性を検討するために、我々は、ニコチンアミド(1-5mM)の存在下でのSir2タンパク質レベルを判定し、これらに変化はないことを見出した。次に我々は、ニコチンアミドがGFPタグ付きSir2の局在化に及ぼす効果を調べた。同一な対数期培養株を5mMに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、その間、GFP-Sir2の局在を、蛍光顕微鏡法で観察した。通常の条件下では、Sir2は、核周縁近傍の顕著な焦点距離に観察することができ、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はテロメアから遊離して、拡散した核内パターンを示す(図11A)。この株を、Sirの非局在化の基準として役立てた。ニコチンアミド中での成長中、我々は、処理された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2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11C及びD)。さらに我々は、Sir3及びSir4という他の2つのSirサイレント状態複合体のメンバを調べた。図5E及びGは、非処理細胞におけるそれぞれSir3-GFP及びGFP-Sir4の局在パターンを示す。

40

5 mMのニコチンアミドで2時間処理しても、これらのタンパク質のいずれでも、GFP蛍光

50

のパターンに変化は起きなかった(図1 1 F及びH)。これらの結果は、Sir2を阻害しても、SIR複合体の全体的な再局在は起きないことを初めて示すものである。

【0254】

ニコチンアミドの存在下におけるSir2とサイレント遺伝子座との間の関係をより詳細に調べるために、我々は処理細胞及び未処理細胞の両方に、クロマチン免疫沈降(ChIP)を行った。sir2変異株及びサイレントになっていないCUP1遺伝子をコントロールとして役立てた。図1 2は、入力され、免疫沈降させたDNAの、5S rDNA特異的プライマ対を用いたPCR産物を示す。細胞を5 mMの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産物の量は変わらなかった(レーン5及び6を比較されたい)ことから、Sir2は、この化合物の存在下ではrDNAと結合したままであることが実証された。

10

【0255】

次に我々は、Sir2と、6番染色体のサイレントHMR遺伝子座並びに右側テロメアのDNA 0.6及び1.4 kbとの結合を調べた。ニコチンアミドの存在下では、HMRに特異的なプライマを用いては、何のPCR産物も得られなかった。同様に、サブ-テロメアDNAに特異的なプライマを用いても、ニコチンアミド処理細胞から得られる産物量は、バックグラウンドに等しかった。これらの結果は、Sir2は、ニコチンアミドで処理された細胞では、HMRにも、又はサブテロメアDNAにも結合していないことを実証している。これはおそらくは、Sir2が、rDNAのRENT複合体で果たす役割と、テロメア及び接合型遺伝子座のヘテロ三量体型SIR複合体で果たす役割との基本的な違いを反映しているであろう。

【0256】

20

ニコチンアミドは、in vitroで酵母Sir2及びヒトSIRT1の両方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非局在化もせず、また下方調節もされなかったため、我々の結果を説明する最も可能性のある解釈は、この化合物が、Sir2デアセチラーゼ活性の直接的な阻害剤として作用したというものである。これをさらに解明し、ニコチンアミドにより誘導されるサイレント解除機序の見識をより深めるために、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、ヒストン基質が脱アセチル化すると蛍光シグナルを生じる新規なクラスI HDAC活性検定法を利用した。アセチル化した基質及びNAD⁺と一緒にインキュベートすると、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の10倍大きな強力な蛍光シグナルを発する。この検定法を用いて、我々は、ニコチンアミドの、多様な濃度のNAD⁺の存在下での脱アセチル化阻害能を調べた。データの二重逆数ラインウィーバー・パーク・プロット(図1 3 A)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を示している。同様な結果は、細胞質Sir2相同体であるHst2についても最近、得られている(54')。我々は、ニコチンアミドの阻害効果が、より高等な真核生物のSir2相同体にも延長できるかどうかを調べたいと考えた。従って我々は、ニコチンアミドがヒトSIRT1もin vitroで阻害できるかどうかを調べた。我々は、組換えSIRT1を用い、多様な濃度のニコチンアミド及びNAD⁺の存在下で基質の脱アセチル化を観察した。Sir2と同様に、データのラインウィーバー・パーク・プロットは、ニコチンアミドはSIRT1も非競合的な態様で阻害することを示している(図1 3 B)。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⁺はこの酵素に同時に結合できること、を示している。

30

40

【0257】

最近、いくつかのグループが、Sir2様タンパク質をin vitro及びin vivoの両方で阻害する化合物を単離した(55'、56')。これらの中にシルチノール、M15及びスプリトマイシンがある。これらの化合物は、サイレント状態の阻害剤として、低分子ライブラリの高スループット表現型スクリーニングで単離されたが、いずれもこれまでのところ、SIRT1活性の阻害能については調べられていない。これらの化合物の阻害の効験を、ニコチンアミドのそれと比較するために、我々は、組換えSIRT1活性を50 µMのこれらの各阻害剤の存在下で測定した。さらに我々は、クラスI/II HDAC阻害剤TSAを陰性コントロール

50

として含めた。図 1 3 C に示すように、ニコチンアミド は $IC_{50} < 50 \mu M$ で SIRT1 を阻害し、この値は、検査された他の全ての阻害剤のそれと同等であるか、又は低かった。我々の *in vivo* の結果をさら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、SIRT1 の活性に対して *in vitro* で何の効果も持たないことを示した (図 1 3 C)。

【0258】

議論

我々は、Sir2 の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加えると、3 つのサイレントな遺伝子座すべてが抑制解除され、リボゾーム DNA 遺伝子座での不安定性が高まり、酵母寿命が sir2 変異体のそれまで縮まる。ニコチンアミドで処理された細胞の、rDNA の不安定性及び短い寿命という表現型は、sir2 変異でも強まらないことは、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、これらの結果はさらに、rDNA の不安定性及び寿命は、もう一方の酵母 Sir2 ファミリ・メンバである Hst タンパク質の影響を受けていないことを示している。

10

【0259】

我々は最近、 NAD^+ 再利用経路遺伝子のコピーを余分に持つ株は、サイレント状態の増加を示し、長命ではあるが、これらの有する定常状態 NAD^+ 又は $NADH$ レベルは増えていないことを示した (実施例 1 を参照されたい)。我々は、寿命の伸びは、 NAD^+ 利用能の局所的な増加か、又は、当該再利用経路を通る流れの増加により媒介されていると仮設した。後者のモデルは、Sir2 ファミリ・メンバ及び / 又は NMN アデニリルトランスフェラーゼを通じて、 NAD^+ からニコチンアミドへの継続的な再循環がある可能性を意味する。我々はニコチンアミドが、G1 期停止細胞においてサイレント状態を失わせることを示し、Sir2 活性がヘテロクロマチンの維持のために構成的に必要であること、そして、Sir2 が NAD^+ を、非周期循環細胞においても消費することを立証した。これは、サイレントな HML 遺伝子座にある MAT 遺伝子は、スプリトマイシンで処理された G1 期細胞で発現するという、ベデロフ氏らによる最近の発見と合致する (56')。

20

【0260】

細胞にニコチンアミドを添加しても、我々が調べた Sir-GFP 融合タンパク質のいずれの局在パターンも変わらない (図 1 1)。これは、Sir2 の局在化を、その活性とは独立に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、より詳細な調査では、Sir2 がまだ rDNA に結合したままでも、それは、この化合物の存在下では、テロメアにも、又は接合型遺伝子座にも結合していないことが分かる (図 1 2)。以前に、RENT 複合体の DNA 結合サブユニットである Net1 は、Sir2 とは独立にクロマチンに結合できることが示されている (57')。これらの発見は、この複合体が、Sir2 デアセチラーゼ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 Sir2/3/4 複合体は、Sir2 触媒活性の非存在下では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、触媒として不活性な Sir2 変異体を用いた他の 2 つのグループから出た最近のデータと一致する (46'、58')。両方のグループとも、触媒ドメイン中の保存されたヒスチジン (His-364) に変異があると、*in vivo* において、Sir2 の、テロメア及び接合型遺伝子座との相互作用が妨げられることを見出している。しかしながら、これらの変異が、Sir2 の他のタンパク質との相互作用能にも影響する可能性が残っている。我々の結果は、結論的には、Sir2 のデアセチラーゼ活性が、テロメア及び接合型遺伝子座とのその適正な結合には必要であることを示すものである。

30

40

【0261】

我々は、ニコチンアミドが、酵母 Sir2 及びヒトの相同体 SIRT1 の両方のデアセチラーゼ活性を *in vitro* で強く阻害することを示した。ニコチンアミドが非競合的に作用して Sir2 を阻害するという事実は、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している。Sir2 脱アセチル化の反応機序や、始生代 Sir2 相同体の結晶構造を調べると、考えられる阻害機序の鍵が得られる。Sir2 を触媒とする脱アセチル化は 2 つの加水分解段階か

50

ら成るが、これらの段階はつながっていると考えられる。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切断に続き、アセチル基とリジンとの間のC-N結合が切断される。最近の構造解析では、Sir2酵素が2つの空間的に別個の NAD^+ 結合部位（B部位及びC部位）を含有し、その両方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は、該B部位に結合した NAD^+ は、それが切断されるC部位近傍にニコチンアミド基を来させるようなコンホメーション変化を起こすことができることを提案する。こうしてこの反応のADP-リボース産物は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、高濃度ではニコチンアミドは内側のC部位に結合すると共にこのC部位を遮断するために、コンホメーション変化が妨げられ、こうして NAD^+ の切断も妨げられるのだと提案する。これが、この化合物の阻害形態の非競合的な性質を説明するものであろう。

10

【0262】

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大半の有効なライブラリから単離された化合物のそれに匹敵することを示した。SIRT1がこのような低濃度のニコチンアミドにより*in vitro*で阻害されるという事実から、この形態の阻害が生理学的に関連している可能性が浮かび上がる。哺乳動物組織中のニコチンアミドのレベルは、11乃至400 μM の範囲内であることが報告されている（30'、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、ここで報告されたニコチンアミドに関する IC_{50} と同様な数値であることが判定された（63'）。我々は、細胞内ニコチンアミドレベルの変動が、*in vivo*ではSir2タンパク質の活性を直接コントロールしているのではないかと提案する。これらの変動は、翻って、ニコチンアミド代謝に関する酵素の調節を受けているであろう。

20

【0263】

酵母PNC1遺伝子は、 NAD^+ 依存的デアセチラーゼを調節するために鍵となる配置にあるニコチンアミダーゼをコードしている。ニコチンアミドをニコチン酸に転化させることにより、Pnc1は、この阻害剤のレベルを下げて、 NAD^+ が再生される速度を刺激しているようである（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に似た条件に応答する最も誘導性の高い遺伝子の1つである（64'、65'）。さらに、PNC1は、その転写産物が細胞周期依存的に変動する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期で最も高く、S期で鋭く低下する。興味深いことに、これは、Sir依存的サイレント状態の確立と一致する（51'、52'、67'）。これらの事実から、S期後や、又は、ストレス及びカロリー制限条件下では、高レベルのPnc1が、ニコチンアミドの阻害効果を外すことにより、サイレント状態を誘導している可能性が浮かび上がる。PNC1のコピーが余分に1つでもあるとSir2依存的サイレント状態が増加する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。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の間に変わるのかどうかを判定することが興味深いであろう。

30

【0264】

ニコチンアミド及びニコチン酸は高用量（最高10g/日）で多様な状態を自己治療するために用いられている（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、癌の再発やインシュリン依存性（1型）糖尿病の治療法として治験中である。ニコチンアミドが、たとえ非周期循環細胞においてもヘテロクロマチンを破壊できることを明確に実証する我々の結果からは、ヒトにおいて長期にニコチンアミド治療を続けることには有害な結果があるかも知れないという懸念が浮かび上がる。

40

【0265】

参考文献

- 1'. Courey, A. J., S.
(2001) Genes Dev 15(21), 2786-96

50

- 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
- 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 10
- 8'. Marks, P. R., R
A. Richon, V M. Breslow, R. Miller, T. Kelly, W K. (2001) *Nature Rev Cancer* 1(3), 194-202
- 9'. Yoshida, M. F.,
R. Nishiyama, M. Komatsu, Y. Nishino, N. Horinouchi, S. (2001) *Cancer Chemother Pharmacol* 48(suppl), S20-6
- 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. 20
- 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., 30
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.
- 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
- 19'. Hecht, A. S.-B. 40
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
- 22'. Gottschling, D.
E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., and Zakian, V. A. (1990) *Cell* 63(4), 751-62. 50

- 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. (1
997) *Genes Dev* 11(2), 255-69.
- 25'. Sinclair, D. A.,
and Guarente, L. (1997) *Cell* 91(7), 1033-42.
- 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.
- 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., 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, 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* 4
0(51), 15456-63.
- 38'. Borra, M. T.,
O'Neill, F. J., Jackson, M. D., Marshall, B., Verdin, E., Foltz, K. R., 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, Merks MA, van der Kogel AJ. (2002)
*Int J Radiat
Oncol Biol Phys* 52(3), 769-78
- 41'. Knip, M. D. I.,
Moore WP, Gillmor HA, McLean AE, Bingley PJ, Gale EA. (2000) *Diabetologia* 43(11)
, 1337-45
- 42'. Foster, J. W.,
Park, Y. K., Penfound, T., Fenger, T., and Spector, M. P. (1990) *J Bacteriol* 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* 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 10
- 47'. Langley, E. P.
M., Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T. (2002) *EM
BO J* 21(10), 2383-2396
- 48'. Llorente, 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, C. C.
E., Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL. (2001) *J Biol Chem* 276(42), 38837-43 30
- 56'. Bedalov, A.,
Gatbonton, T., Irvine, W. P., Gottschling, D. E., and Simon, J. A. (2001) *Proc N
atl 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, C. K.
M., Imai SI, Guarente L. (2002) *Mol Biol Cell* 13(4), 1427-38
- 59'. Min, J. L. J., 40
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, 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. 50

- 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. 10
- 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), 1985-93.
【 0 2 6 6 】

実施例 3 : ニコチンアミドはSir2のCポケットに結合するがニコチン酸は結合しない
ニコチンアミドを、 NAD^+ に結合したアルカエグロブス-フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*) 由来のSir2 (Sir2-Af1) の結晶構造 (タンパク質データバンク ID コード 1IC1, Min et al.
(2001). *Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. Cell* 105, 269-279) に嵌め込んだ。それをまず、Sir2-Af1のC部位に、QUANTA (MSI社) を用いて手動で嵌め込んだ。次に、エネルギー最小化計算を CHARMM (Brooks et al.
(1983) *J. Comput. Chem.* 4, 187-217) により、Sir2-Af1及び NAD^+ ($F = 2.4 \text{ Kcal/mol}^2$) の調和定数を用いて行った。図 1 4 A - C を PYMOL (DeLano, W.L. *The PyMOL Molecular Graphics System*
(2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA) を用いて作製した。
【 0 2 6 7 】

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) 、そしてニコチン酸は、残基D101 (即ち酸性) が存在するためにニコチン酸がSir2のCポケットに嵌め合うことができないために、Sir2を阻害しないことを示している。 30
【 0 2 6 8 】

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 はアミドの加水分解を触媒し、ニコチンアミドをニコチン酸に NAD^+ 再利用経路で転化させる (図 1 7 B) 。大半の野生型酵母株は 2 1 乃至 2 3 回の分裂という平均寿命を有し、最大寿命は 4 0 回の分裂である。カロリー制限 (0.5%グルコース) 又は熱ストレス (3 7) を与えた野生型株は、未処理のコントロール (それぞれ 2.0% グルコース又は 3 0) に比較して長い寿命を示した (図 1 7 C 及び D) 。sir2D 株は、前の報告と一致して短い寿命を有し^{1 2 , 1 3}、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、これらの条件下のいずれでも、寿命の延びを示さず、PNC1 が寿命の延びに必要であることが実証された。 40
【 0 2 6 9 】

驚くべきことに、非ストレス条件 (2% グルコース、3 0) 下では、PNC1 の付加的なコピーを持つ株 (5×PNC1) は、野生型よりも 7 0 % 長く生き、いくつかの細胞は、この生物で報告された最長の寿命の延びである 7 0 回を超える分裂回数を生きた (図 1 7 E) 。カロリー制限も熱ストレスも、5×PNC1株の寿命をそれ以上、増加させなかった。5×PNC1バックグラウンドでSIR2を欠失させると、寿命がsir2D 株のそれまで縮んだ (図 1 7 E) 。 pnc1D
sir2D

二重変異体も、sir2D 変異体と同様な寿命を有しており (図 1 7 E) 、その寿命はグルコース制限の影響を受けなかった。このことは、PNC1 及びSIR2 は同じ経路で機能し、PNC1 50

は寿命をSIR2を通じて延ばすことを示すものである。

【0270】

このように、これらの結果は、PNC1が、カロリー制限及び熱ストレスの両方による寿命の延びに必要であり、付加的なPNC1があれば、これらの刺激を模倣するのに充分であることを実証している。我々のモデルによると、PNC1の付加的なコピーがあると、ニコチンアミドを枯渇させてSir2の阻害を緩和させることにより、寿命が延びるのである。

【0271】

実施例5：PNC1の発現は、ストレス条件に応答して増加する

S・セレビジエを様々なストレス条件でインキュベートし、PNC1の発現レベルを、ウェスタン・プロットを行って測定した。2.0%グルコース完全培地（YPD）中で成長させた酵母細胞で測定されたPNC1の量を1に設定した。下の表及び図18は、この基準発現レベルに比較したときの様々な成長条件でのフォールド（原語：fold）誘導を示す：

10

【0272】

【表5】

培養条件	フォールド比較
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
合成完全培地 (SD) + アミノ酸	5
合成完全培地 (SD) - アミノ酸	20
2% YPD 中で熱ショック (37度で4時間)	20
浸透圧ストレス (0.1 M NaCl)	15

20

【0273】

さらに、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た。上記の「ストレス条件」、即ち2.0% グルコース完全培地（YPD）以外の条件、はすべて、S・セレビジエ（カロリー制限）の寿命を延ばしたため、PNC1の増加は、アミノ酸制限、塩ストレス及び熱ストレスを含め、酵母寿命を延ばすことが公知の検査されたすべての条件で寿命の延びと相関する（図18C）。ストレス応答のゲノム・ワイドmRNAプロファイルの解析（Gash）では、PNC1が、この生物でストレス及び飢餓に応答する応答性の最も高い遺伝子の1つであることが示された。さらにPNC1レベルは、cAMPを下げることによりカロリー制限を模倣するcdc25-10 対立遺伝子を持つ細胞でも大きく誘導された（図18B）。

30

【0274】

この応答が環境ストレスに特異的であったかどうかを検査するために、我々は、NAD⁺のde novo合成には必要であるが、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Pnc1レベルを調べた^{1,2}。この変異体において、Pnc1レベルは変わらなかった（図18B）。処理された細胞からの抽出物中のPnc1活性はウェスタン・プロットのPnc1レベルと相関した（図18D）ことから、これらの細胞のニコチンアミド加水分解速度が増していることが実証された。このように、PNC1は、その発現が寿命を延ばす刺激により調節される一番目の酵母寿命遺伝子である。

40

【0275】

従って、PNC1の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保護する方法は、ここでさらに解説するように、細胞内の天然の事象を模倣するものである。

【0276】

実施例6：PNC1が付加的にあると急性ストレスに対する耐性がもたらされる

他の種での寿命とストレス耐性との間の強い関係に基づき、我々は、PNC1が付加的にあ

50

るとある範囲のストレスへの耐性ももたらされるかどうかを検査した。酵母においてよく特徴付けられたストレス耐性検査は、細胞の高塩濃度に対する耐性である^{2 6}。我々は、5×PNC1株が高いレベルのNaCl(600mM)及びLiCl(200mM)の両方に対して、野生型よりも劇的に耐性が高かったことを見出した(図19A)。さらに我々は、紫外線照射(5mJ/cm²)によるDNA損傷後の生存率も調べ、やはり、PNC1が付加的にあると耐性も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に関係があるとされているため^{2 7}、さらに我々は、付加的なPNC1のこの種類のストレスからの保護能力も調べた。強制換気条件(3%グリセロールを炭素供給源とする)下では、5×PNC1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だった(図19C)。5×PNC1株のLiClに対する耐性増加はSIR2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からは独立だった(図19A-C)。これらの結果は、PNC1が長寿及びストレス耐性の両方を促進することを実証しており、SIR2が、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以外のタンパク質も調節している可能性が高い。

10

【0277】

実施例7：多種のストレス条件下でのPNC1の細胞内局在化

我々は前に、NAD⁺再利用経路中の2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(ニコチン酸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^{2 3}。我々は、別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査した。驚いたことに、完全2%グルコース培地上ではPnc1-GFPは細胞質、核、及び細胞一個当たり3乃至6箇所の離散した細胞質内焦点距離に観察された(図20A)。カロリー制限した又はストレスを与えた細胞は、ウェスタン・データと一致して、蛍光輝度の劇的な増加を示した。興味深いことに、アミノ酸制限又は塩ストレスの条件下では、このパターンは変化しており、蛍光は主に焦点距離に局在していた(図20B)。このことは、Pnc1の局在は、異なるストレスにより異なる方法で調節されていることを示すものである。

20

【0278】

この焦点距離の正体を判定するために、我々は、Pnc1-GFPと同時局在する細胞内マーカーを探した。我々は、ペルオキシソームを標的とする赤色蛍光タンパク質(RFP)で大きな重複を観察した(図20C)。さらに、Pnc1-GFPの焦点距離は、ペルオキシソームを形成することができない 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、ペルオキシソームへのPnc1の局在が調節可能かも知れないことが示されていたため、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ーを特定しようと試みた。Pex5はペルオキシソーム性タンパク質の大半を輸入するが、Pnc1のペルオキシソームへの局在には、より利用頻度の低いトランスポーターPex7が必要だった(図20D)。Pnc1の、核より外側の部位への局在は、ニコチンアミドがSir2以外のタンパク質を調節することを実証した我々のストレス結果と一致している。ペルオキシソームへの局在は、これらのオルガネラは反応性酸素種の主要な供給源であり、哺乳動物の老化への関与が指摘されている^{2 8}、^{2 9}ために、特に興味深い。加えて、脂質代謝の数多くの重要なステップがペルオキシソーム内で行われ、脂質シグナル伝達は最近、塩耐性にも関連付けられている^{2 6}。付加的なPNC1の耐塩性は、Pnc1のペルオキシソーム機能の結果かも知れない。

30

40

【0279】

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る負の調節を受ける

我々の予測モデルの1つは、細胞内ニコチンアミドレベルを何らかの方法で操作すると、Sir2活性を変えるには充分なはずであるというものである。Sir2活性の通常の指標は、rDNA(RDN1)に挿入されたレポーター遺伝子がサイレントになる程度である。NAD⁺レベルがいずれかのサイレント効果を担っている可能性を除外するために、我々は、NAD⁺再利用経路の外にある遺伝子を用いて細胞内ニコチンアミドレベルを操作することを試みた。

50

ヒトでは、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) を通る^{3 0}。NNMTはニコチンアミドをN'-メチルニコチンアミドに転化させ、このN'-メチルニコチンアミドが腎臓を通じて排出される^{3 1}。我々は、相同性により、S. セレビジエNNMT遺伝子を同定し、この遺伝子を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^{3 0}、S-アデノシルメチオニン (SAM) 依存的メチルトランスフェラーゼの4つのシグナチャ・モチーフを含有する^{3 2}。

【0280】

NNT1 を欠失させると、PNC1 の欠失と同様なサイレント解除表現型が起きた^{3 3} (図2 1 A)。これらの結果は、rDNA サイレント状態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一致する (実施例2)。予測通り、付加的なNNT1 を持つ株は、付加的なPNC1を持つ株と同様に、サイレント状態の増加を示した^{2 3}。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及びNNT1のレベルの変更により調節することができると結論する。NNT1 はPNC1 表現型を模倣できるが、PNC1とは異なり、その発現は、寿命を延ばす刺激では見かけ上、調節されないことは注目に値する^{2 5}。

10

【0281】

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延ばす、カロリー制限及びストレス応答性遺伝子であると特定した (図2 1 B)。我々は、カロリー制限による寿命の延びは、特異的調節遺伝子により調和させられた能動的な細胞による防御的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、それが細胞恒常性に関与する必須コファクタであるNAD⁺ の調節には基づかないことである。

20

【0282】

我々には、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数多くの急性ストレスに対する耐性をもたらすのかは、まだ不明である。おそらくは、Pnc1増加という利益は進化上の代価として生じたのであるが、我々はまだ、淘汰上の不利益は特定していない。我々のストレス及び局在結果の両方で、複数のニコチンアミド調節性エフェクタが存在することが示されている。ニコチンアミド によるSir2阻害の酵素学に基づき (実施例2 及び^{3 4})、NAD⁺ を2段階の反応で切断するタンパク質が考えられる候補である。例には、Sir2 (Hst1-4) 及びTpt1の相同体、タンパク質の変性応答を促進するNAD⁺ 依存的2'-ホスホトランスフェラーゼがある^{3 5}。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をすれば、これらのエフェクタや、ストレス耐性の下流経路を特定する助けになるはずである。

30

【0283】

哺乳動物では、ニコチンアミド代謝とストレス耐性との間の関係の証拠がある。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) は、ポリ (ADP-リボース) をアクセプタタンパク質に共有結合させるためにNAD⁺ を切断する核内酵素である。この2段階の反応はニコチンアミドを生じるが、このニコチンアミドが、PARP-1に対して阻害効果を発揮し、自己調節を可能にしている^{3 6}。PARP酵素については、DNAの損傷修復、テロメア長の調節、ヒストン修飾、及び、ICAM-1及び酸化窒素シンターゼを含む主要なタンパク質の転写レベルでの調節を含め、数多くの細胞機能との関連が示唆されてきた^{3 6}。我々の結果は、PARP酵素が、一般的なストレス応答の一部としてニコチンアミド代謝により調節されている可能性を示唆している。ニコチンアミドはさらに、in vitro (実施例2) 及び in vivo^{1 7} の両方でヒトSIRT1を阻害する。SIRT1 はp53活性を負に制御することから、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^{1 7}、^{1 8} 可能性が分かる。これと一致して、ヒト細胞及び組織でのNNMTの発現は、腫瘍発生^{3 7} 及び放射線抵抗性^{3 8} と相関している。

40

【0284】

実施例9: 実施例4 - 8の材料及び方法

培地及び株: 全ての株を、他に記載しない限り、30 の完全2.0% (w/v) グルコース (YPD) 培地で成長させた。実験のすべてで、我々は、空のベクタを組み込むことにより、確実に株同士の間で栄養要求性マーカが一致しているようにした。欠失はすべて、ka

50

nMX6 PCRベースの技術^{3 9}を用いて作製され、PCRで確認された。PNC1 の付加的なコピーは、前に解説した通りに組み込まれた^{2 3}。NNT1 (YLR285w) の開放読み取り枠全体及び700塩基の上流配列を、ゲノムDNAからPCRによりpSP400中にクローニングし^{4 0}、配列決定し、酵母ゲノムに前に解説した通りに組み込んだ^{2 3}。組み込まれた遺伝子のコピー数は、サザン・ブロット法で判定された。GFP カセットを、天然 PNC1 遺伝子の3'側にインフレームで前に解説した通りに導入した^{3 9}。RFP-PTS1プラスミド (pSG421) は S. J. グールド氏 (ジョンズ・ホプキンス大) から提供された。PSY316AT由来株を寿命の分析及びストレス耐性検定に用いた。PSY316ATを由来とする株 (MAT⁻, 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・ブロット分析、蛍光顕微鏡法及びSIR2 依存的サイレント状態検定法に用いた。W303 (MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5) を由来とする株には : PNC1-GFP (YDS1742)、pnc1D (YDS1911)、nnt1D (YDS1747)、2xPNC1 (YDS1588)、2xNNT1 (YDS1926)、ADE2 (YDS1596)が含まれた。以下の株をPNC1-GFP (YDS1742)から得た : bna6D (YDS1857), pSG421 (YDS1916), pex6D (YDS1869), pex5D (YDS1870) 及びpex7D (YDS1871)。cdc25-10 株は L. ギャランテ氏 (M. I. T. 大) から提供された。

10

【0285】

酵母検定法を以下の通りに行った。寿命測定を前に解説した通りに行った^{2 3}が、例外として、熱ストレス実験では、株を各剥離後に37℃でインキュベートした。ストレス耐性検定は、対数期中期細胞を用いて行われた。サイレント状態は前に解説した通りに検定された^{2 3}。

20

【0286】

タンパク質発現分析を以下の通りに行った。株を記載した条件下で予備処理し、対数期中期まで成長させた。ウェスタン・ブロット法は、解説した通りに^{2 3}全細胞抽出物 (75 µg) を用いて行われた。タンパク質は抗GFP抗体 (サンタクルズ社) 又は抗アクチン抗体 (ケミコン社) を用いて検出された。蛍光顕微鏡画像を、ハママツ Orca100 CCD カメラで倍率を100×にして同じ露出 (1s) で撮像し、Openlabソフトウェアで処理した。

30

【0287】

ニコチンアミド活性検定は以下の通りに行われた。予備処理された対数期中期培養株から得られた抽出物中のPnc1の活性は前に解説した通りに判定された^{4 1}。簡単に説明すると、0.16 mg のタンパク質を0もしくは8 mMのニコチンアミドと一緒に45分間、30℃で、10 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl 及び1 mM MgCl₂から成る最終体積400 µlにしてインキュベートした。Pnc1活性は、反応生成物であるアンモニアの最終濃度を、シグマ・アンモニア・ダイアグノスティック・キットを用いて測定することで判定された。ニコチンアミドなしのコントロールを減算することで、基礎アンモニアを斟酌した。ニコチンアミド活性を、生じたアンモニアnmol / 分 / 総タンパク質mg で表した。Pnc1活性は、pnc1D 株 (0.06 ± 0.004 nmol / 分 / mg) のバックグラウンド値を減算することで得られた。

40

【0288】

実施例 4 - 9 の参考文献

1. Masoro, E. J. Exp Gerontol 35, 299-305. (2000).
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

50

Bioessays 10, 125-7. (1989).

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).

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).

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 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).

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 et al.

10

20

30

40

50

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. (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, 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. (1998).

40. Mills et al. Cell

97, 609-20. (1999).

41. Ghislain et al.

Yeast 19, 215-224. (2002).

10

20

【0289】

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) はヒト細胞の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 (さらにCantoni (1951) J.

30

Biol. Chem. 203-216も参照されたい)。放射線感受性ヒト細胞中でヒト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。

【0290】

均等物

当業者であれば、ごく慣例的な実験によって、ここに解説した本発明の具体的な実施態様の均等物を数多く、認識し、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】

40

【0291】

【図1】図1は、NPT1を増量投与すると、カロリー制限を模倣することにより老化が遅れることを示す。寿命は、細胞分裂停止前に各母細胞が生じる娘細胞の数を採点することにより、判定された(7, 10)。細胞は完全グルコース培地上で最低48時間、予め成長させた。Aは、野生型 (PSY316AT、丸)、2xNPT1 (YDS1544、ダイヤモンド) 及び5xNPT1 (YDS1548、三角) の2% グルコースを加えた培地上での死亡曲線を示す。平均寿命はそれぞれ21.9、30.8 及び35.1世代だった。Bは、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2% グルコース培地上での死亡曲線を示す。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は、2%

50

グルコース (PSY316AT、丸) 及び 0.5% グルコース培地 (PSY316AT、四角) 上の野生型、及び 0.5% グルコース 培地 (YDS1544、三角) 上の 2xNPT1 の死亡曲線を示す。平均寿命はそれぞれ 21.9、31.7 及び 34.5 世代である。

【図 2】図 2 は、NPT1 及び SIR2 が熱ショックに対する耐性を提供することを示す。A では、株を、ディオキシー移相後 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、10 倍希釈にして SC プレート上にプレートした。B では、株を A の通りに処理し、SC プレート上に低密度になるようにプレートした。24 時間後に生じたコロニを採点し、未処理試料から生じたコロニのパーセンテージで表した。数値は、3 つの個別の実験の平均を表す (+ / - s.d.)。株: W303AR URA3(YDS1568)、W303AR URA3LEU2 (YDS1563) 並びに W303AR、2xNPT1-URA3 (YDS1503)、2xSIR2-URA3 (YDS1572) 及び 2xNPT1-URA32xSIR2-LEU2 (YDS1561) の同質遺伝子型由来体。

【図 3】図 3 は、付加的な NPT1 があるとサイレント状態及び rDNA 安定性が増すことを示す。A では、rDNA に ADE2 マーカを持つ株を SC プレート上で予備成長させ、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では成長の遅延によりサイレント状態の増加が示されている。株: W303-1A ADE2(YDS1596)、W303-1A RDN1::ADE2(W303AR5) 並びに W303AR5 由来体 2xNPT1(YDS1503)、2xSIR2 (YDS1572) 及び 2xNPT1 2xSIR2(YDS1561)。B では、rDNA 遺伝子座にある MET15 のサイレント状態を、JS237 の同質遺伝子型由来体を、0.07% PbNO₃ を含有する栄養培地に画線し、5 日間 30 でインキュベートすることにより、検定した。茶色の色素の蓄積により、サイレント状態の増加が示されている。関連する遺伝子型: 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 では、rDNA 遺伝子座にある ADE2 マーカのサイレント状態を、1xNPT1、2xNPT1、及び 2 µ NPT1 を以下のバックグラウンドで持つ株で判定した: 野生型 (W303AR5、YDS1503、YDS1496)、sir2::TRP1 (YDS878、YDS1504、YDS1494)、sir3::HIS3 (YDS924、YDS1505、YDS1587)、及び sir4::HIS3 (YDS882、YDS1506、YDS1495)。D では、ADE2 マーカをテロメアに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ト状態の増加が示されている。関連する遺伝子型: (PSY316AT)、2xNPT1(YDS1544)、5xNPT1(YDS1548)、5xNPT1 2xSIR2(YDS1577) 及び 5xNPT1 SIR2::TRP1(YDS1573)、sir2::TRP1 (YDS1594)。E では、A の株を、rDNA 遺伝子座に組み込まれた ADE2 マーカの消失率を調べることにより、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、一回目の細胞分裂でのマーカ消失事象を反映した半円弧型のコロニの頻度を測定した。10,000 個を超えるコロニを各株について調べ、各実験を三重にして行った。細胞分裂一回当たりの平均組換え頻度 (+ / - s.d.) を示す。F は、野生型 (W303AR)、sir2::TRP1 (YDS878) 及び 2xNPT1sir2::TRP1 (YDS1504) 株のリボゾーム DNA 組換え率を示す。検定は (E) の通りに行われた。

【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 では、3xHA タグ配列を、W303AR5 (YDS1531) 及び W303cdc10-25 (YDS1537) の天然 NPT1 ORF の 3' 側末端にインフレームで挿入した。細胞を 30 の YPD 培地で成長させ、解説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) で成長させた W303AR5 と、YPD (2% グルコース) で成長させた W303cdc25-10 で調べた。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。同様な結果を PSY316 株バックグラウンド (図示せず) で得た。B では、A の培養株からのタンパク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 -HA 抗体を用いて検出した。53 kD 及び 40 kD の 2 つのバンドが Npt1-HA 株で検出され、タグのついていないコントロール株にはバンドは検出されなかった (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。同様な結果を PSY316 株バックグラウンドで得た (図示せず)。C では、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)、又は熱ショック (55 °C) への曝露後 1 時間で調べた。D では、C の培養株のタンパク質抽出物を B の通りに分析した。E 及び F では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 配列を、W303AR5 (それぞれ YDS1611 及び YDS1624) の天然 NPT1 及び NMA2

ORFの3'側末端にインフレームで挿入した。細胞を30のYPD培地で対数期中期まで成長させ、生きた状態で撮影した。GFP(緑色)及びHoechst DNA染料(偽性赤色)の重複領域は、組合せ画像では黄色に見える。

【図5】図5は、 NAD^+ 再利用率の複数の制限成分を示す。Aは、サルモネラで公知のステップに基づく、S.セレビジェでの NAD^+ 生合成の推定ステップを示す。各ステップを媒介してい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。Bは、株ADE2(YDS1596)、野生型(W303AR5)、2xNPT1(YDS1503)、2xPNC1(YDS1588)、2xNMA2(YDS1589)、2xNMA1(YDS1590)、及び2xQNS1(YDS1614)でのrDNA遺伝子座でのADE2のサイレント状態を示す。サイレント状態の増加は、アデニンを欠く培地上で成長遅延により示されている。Cでは、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。サイレント状態は赤色色素の蓄積で示されている。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)。

10

【図6】図6は、 NAD^+ 再利用率を通る流れ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IIヒストンデアセチラーゼは、 NAD^+ をニコチンアミドに転化することにより、この再利用率で重要なステップを触媒する。PNC1、NPT1、NMA1及びNMA2のコピーが付加的にあると、 NAD^+ 再利用率を通る流れが増加し、それによりSir2活性が刺激されて寿命が増す。QNS1の付加的なコピーがあってもサイレント状態は増加しない。なぜなら、この経路の他のステップとは異なり、その基質はこの再利用率の外にある供給源からは提供されず、従ってこの反応に限界があるからである。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^+ 。

20

【図7】図7は NAD^+ 再利用率を示す。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れ、次に NAD^+ に、と3段階で戻される。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のサイレント状態を阻害することを示す。Aでは、rDNA遺伝子座でのサイレント状態を、JS237(RDN1::MET15)の同質遺伝子型由来株を、0.07% PbNO_3 及び0、1、もしくは5 mMのニコチンアミドを含有する栄養培地上に画線することで検定した。MET15マーカのサイレント状態が、茶色の色素の蓄積で示されている。RDN1::MET15株の一個の暗褐色のコロニはマーカ消失事象を表すものである。関連する遺伝子型：met15D(JS209)、MET15(JS241)、RDN1::MET15(JS237)、sir2::TRP1(JS218)、2xSIR2(YDS1583)。Bでは、テロメアにADE2マーカを持つ株を、制限量のアデニンと、0もしくは5 mMのニコチンアミドを含有するSC培地上に画線した。ADE2マーカがサイレント状態になると、赤色の色素が蓄積する。関連する遺伝子型：(PSY316AT)、W303-1A ADE2(YDS1596)及びW303-1A ade2(YDS1595)。

30

【図9】図9は、ニコチンアミドがrDNA組換えを増加させ、酵母寿命を縮めることを示す。Aでは、rDNA遺伝子座に組み込まれたADE2マーカの消失率を調べることににより、rDNA安定性について株を検定した。細胞を5 mMのニコチンアミド(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、一回目の細胞分裂時のマーカ消失事象を反映する半円弧型のコロニの頻度を測定した。10,000個を超えるコロニを各株について調べ、各実験を三重にして行った。一回の細胞分裂毎の平均組換え頻度(+/-s.d.)を示す。関連する株：W303-1A RDN1::ADE2(W303AR5)並びにW303AR5由来体 2xSIR2(YDS1572)及びsir2::TRP1(YDS878)。Bでは、ニコチンアミド(NAM)及びニコチン酸(NA)の構造の比較を示す。C及びDでは、細胞分裂停止前の各母細胞から生じた娘細胞の数を採点することにより、寿命を判定した(68'69)。細胞を最低48時間、完全グルコース培地上で予備成長させた。Cは、野生型(PSY316AT)及びsir2::TRP1(YDS1594)株の0又は5 mM ニコチンアミド(NAM)中での死亡曲線を示す。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は、Cの野生型及びsir2株の0、5 mM 又は50 mM の

40

50

ニコチン酸 (NA) の存在下での死亡曲線を示す。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、周期循環中及び G1 期停止細胞の両方において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 では、HMR 遺伝子座 (YDS970) に ADH 作動性 GFP 転写産物を含有する PSY316 細胞を、30 の YPD 培地で対数期中期まで成長させ、5 mM のニコチンアミド (NAM) で提示した時間、処理した。細胞を生きた状態で撮影した。B では、株 YDS970 又は同質遺伝子型 sir4D 変異体 (YDS1499) を 5 mM のニコチンアミド (NAM)、5 mM のニコチン酸 (NA) 又は 5 mM のキノリン酸 (QA) のいずれかで処理した。細胞を蛍光活性化セル・ソーティング (FACS) で分析して、ADH-GFP 発現の程度を判定した。C では、株 YDS970 の MATa 由来体 (YDS1005) を HML について欠失させ、10 µg/ml 因子で 3 時間、処理した。次に細胞を 5 mM のニコチンアミドの存在下で提示した時間、成長させ、FACS で上記の通りに調べた。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。

10

【図 11】図 11 は、ニコチンアミドが Sir タンパク質の局在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 sir2 由来体を 2 時間、5 mM のニコチンアミドの存在下で成長させた。GFP 蛍光を生存細胞で検出した。

【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、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 では、ポリクローナル Sir2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を、sir2 (YDS878) (A) 又は野生型 (W303AR5) (B) 株からの抽出物に対し、5 mM ニコチンアミド (NAM) の存在下で行った。全細胞抽出物と、免疫沈降後のクロマチンの両方を由来とする入力 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)、又はテロメアのうちのサブテロメア DNA 1.4 及び 0.6 kb (一番下のパネル) に特異的なプライマ対を用いて行われた。プライマの配列を表 4 に挙げる。

20

【図 13】図 13 は、ニコチンアミドは、in vitro において酵母 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 では、組換え GST タグ付き Sir2 を、アセチル化基質と一緒に 30 分間、30 で、1 mM の DTT、200、350、500 もしくは 750 µM 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。展開剤を添加することで反応を停止させ、試料を蛍光分析法 (励起は 360 nm に設定し、発光は 460 nm) で分析した。実験は三重にして行った。データは、任意蛍光単位 (AFU) 分⁻¹ 対、NAD⁺ (µM) のラインウィーバー・パーク二重逆数プロットとして示されている。B では、実験を A の通りに行ったが、例外として、組換え ヒト SIRT1 を使い、反応は 37 で行われた。C では、脱アセチル化反応を三重にして、2.5 µg の SIRT1、1 mM DTT、200 µM NAD⁺ と、50 µM の水空試験、DMSO 空試験、ニコチン酸、シルチノール、M15、スプリトマイシン又はニコチンアミドのいずれかとで行った。反応を 37 で 30 分間、行わせ、蛍光を A の通りに測定した。

30

【図 14】図 14 A - C は、Sir2-Af1 の保存された C ポケットに嵌め合わせたニコチンアミドを示す。(A) 左側のパネルは、結合した NAD⁺ を紫色にし、アセチル-リジン結合トンネルを赤色の矢印で指し示した、Sir2-Af1 の表面図の前面図を示す。C 部位は、破線の緑がかかった青の曲線で描かれている。右側のパネルは、破線を通して切断し、その垂直軸に沿って 90 度回転させた該タンパク質を示す。C 部位の保存された残基の表面は緑がかかった青に着色されている。(B) A の右側のパネルで描かれた黒い矩形の近接図であり、Sir2-Af1 の C ポケットに深く嵌め合わされたニコチンアミドを示す。(C) C ポケットの保存された残基に取り囲まれた、嵌め合わされたニコチンアミド (緑色) の立体図を示す。推定上の相互作用を破線で示し、水素結合 (青色)、静電的 (マゼンタ) 及びファンデルワールス (黄色) が含まれている。

40

【図 15】図 15 は、NPT1 相同体のアライメントを示す。

【図 16】図 16 は、PNC1 相同体のアライメントを示す。

50

【図 17】図 17 A - E は、カロリー制限及び熱ストレスが、PNC1-依存的な態様で寿命を延ばすことを示す。(A) は、Pnc1がニコチンアミドのニコチン酸への転化を触媒することを示す。(B) は、酵母では、 NAD^+ は、トリプトファンから *de novo* 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することを示す。(C) は、グルコース制限による寿命の延びには、PNC1が必要であることを示す。2.0% (w/v) グルコースを含有する完全培地上の平均寿命は：野生型、(21.6); pnc1D, (19.1); sir2D, (14.2)だった。0.5% グルコース上の平均寿命は：野生型、(32.7); pnc1D, (18.1); sir2D, (14.7)だった。(D) は、穏やかな熱ストレスへの曝露による寿命の延びを示す。30 °C のときの平均寿命は：野生型、(19.4); pnc1D, (18.5); sir2D, (12.0)だった。37 °C のときの平均寿命は：野生型、(23.4); pnc1D, (17.5); sir2D, (10.6)だった。(E) 付加的な PNC1 があると寿命が SIR2 依存的な態様で延びることを示す。2.0% グルコース/30 °C 上の平均寿命は：野生型、(19.7); 5xPNC1, (36.1); sir2D, (14.2); 5xPNC1 sir2D, (15.1); pnc1D?sir2D, (14.4)だった。

【図 18】図 18 A - D は、Pnc1 レベル及び活性は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) は、抗 GFP 抗体を用いた、酵母全細胞抽出物中の Pnc1-GFP の検出を示す。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培養株から作製された。(B) は、対数期中期野生型、cdc25-10 又は bna6D 培養株からの抽出物で、上述した通りに検出された Pnc-1GFP レベルを示す。(C) は、対数期中期野生型培養株からの抽出物、で上述した通りに検出された Pnc-1GFP を示す。培養株を以下の条件で成長させた：完全培地 (処理なし)、合成培地 (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)、熱ストレス (37 °C)、ソルビトール (1M)。(D) は、提示した条件下で成長させた対数期中期野生型培養株の細胞抽出物からの Pnc1 によるニコチンアミド脱アミン化の測定を示す。示した数値は、3 つの個別の実験の平均である。活性は、生じたアンモニア nmol / 分 / 総タンパク質の mg、 \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 °C 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) は、付加的な PNC1 が塩ストレスに対する耐性をもたらすことを示す。対数期中期コロニからの細胞を 600 mM NaCl 又は 200 mM LiCl を含有する完全培地上に塗り、4 日間、25 °C でインキュベートした。標準酵母培地 (2% グルコース、25 °C) には、野生型、5xPNC1、又は 5xPNC1 sir2D 株間で成長速度に検出可能な違いはなかった。(B) は、付加的な PNC1 が紫外線で誘導される損傷から SIR2 独立な態様で保護することを示す。対数期中期培養株からの細胞を低密度で完全培地にプレートし、紫外線 (5 mJ/cm^2 , 254nm) に曝露した。暗室で 30 °C で 3 日間成長させた後にコロニを形成する能力により、生命力を判定した。数値は、生命力有りのパーセント \pm s.e. で表されている。(C) は、PNC1 が、ミトコンドリア DNA 損傷からの SIR2 独立な保護を提供することを示す。完全 3% (v/v) グリセロール培地及び $10 \mu\text{g/ml}$ 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分析。少なくとも 100 個のミクロコロニを 2 つの別個の実験で 3 日後に採点した。コロニ一個当たりの細胞数 \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。EtBr を加えた、完全 2% (w/v) グルコース培地上のこれらの株の間に成長の違いは検出されなかった。

【図 20】図 20 A - D は、Pnc1-GFP が細胞質及び核内に局在しており、ペルオキシソームに濃縮していることを示す。(A) では、Pnc1-GFP 蛍光を、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培養株から採取した細胞で検出した。(B) では、以下の条件下で成長させた野生型培養株からの細胞中の Pnc1-GFP の検出を示す：アミノ酸 (a.a.) 制限 (非必須アミノ酸を欠く SD)、塩ストレス (300 mM NaCl)、熱ストレス (37 °C)。(C) では、対数期中期野生型培養株からの細胞中の Pnc1-GFP (緑色) 及び RFP-PTS1 (Peroxisomal Targeting Signal 1) (赤色) の同時局在を示す。黄色は重複を示す。培養株を 0.5% グルコ

ースを含有する完全培地で成長させて、蛍光の観察を容易にできるようにした。(D)では、ペルオキシソーム変異株、*pex6D*、*pex5D* 及び *pex7D*の対数期中期培養株からの細胞中のPnc1-GFPの局在を示す。培養株を、0.5% グルコースを含有する完全培地中で成長させて、蛍光の観察を向上させるようにした。画像はすべて、1秒という同じ露出で撮影された。

【図21】図21A-Bは、ニコチンアミド代謝を操作すると、SIR2依存性のサイレント状態に影響があることを示す。(A)では、サイレント状態を測定するために、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上での成長増加が、ADE2 サイレント状態の低下の指標となる。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)は、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を示す。カロリー制限、熱及び浸透圧ストレスを含む異種の環境刺激は、寿命及びストレス耐性の共通の経路への入力として働く。細胞は、ニコチンアミドをニコチン酸に転化する酵素をコードするPNC1の転写を誘導することにより、これらの入力への応答を調和させる。ニコチンアミドを枯渇させると、Sir2の阻害を緩和し、寿命を促進するだけでなく、ストレス耐性及びおそらくは他の細胞内プロセスに關与する数多くの更なる標的タンパク質が活性化する。

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sinclair, David
 <120> Methods and Compositions for Extending the Life Span and Increasing
 the Stress Resistance of Cells and Organisms
 <130> HMV-085.61
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 1290
 <212> DNA
 <213> *saccharomycetes cerevisae*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1290)
 <400> 1

atg tca gaa cca gtg ata aag tct ctt ttg gac aca gac atg tac aag	48
Met Ser Glu Pro Val Ile Lys Ser Leu Leu Asp Thr Asp Met Tyr Lys	
1 5 10 15	
att acg atg cat gct gct gtc ttc act aat ttt cca gat gtt aca gtt	96
Ile Thr Met His Ala Ala Val Phe Thr Asn Phe Pro Asp Val Thr Val	
20 25 30	
act tat aaa tat acc aac agg tcg tcc caa ttg acc ttc aat aag gaa	144
Thr Tyr Lys Tyr Thr Asn Arg Ser Ser Gln Leu Thr Phe Asn Lys Glu	
35 40 45	
gcc att aat tgg ttg aaa gag caa ttt tcg tat ttg gga aat ttg agg	192
Ala Ile Asn Trp Leu Lys Glu Gln Phe Ser Tyr Leu Gly Asn Leu Arg	
50 55 60	
ttc aca gaa gag gaa att gaa tac tta aaa cag gaa atc cca tat ttg	240
Phe Thr Glu Glu Glu Ile Glu Tyr Leu Lys Gln Glu Ile Pro Tyr Leu	
65 70 75 80	
cca tcg gca tat att aag tat att agc agt tct aat tac aaa cta cac	288
Pro Ser Ala Tyr Ile Lys Tyr Ile Ser Ser Ser Asn Tyr Lys Leu His	
85 90 95	
cct gaa gag cag att tcc ttc act tca gaa gaa atc gag ggc aag ccc	336
Pro Glu Glu Gln Ile Ser Phe Thr Ser Glu Glu Ile Glu Gly Lys Pro	
100 105 110	
acc cac tac aaa ttg aaa att tta gtc agt ggt agt tgg aag gat act	384
Thr His Tyr Lys Leu Lys Ile Leu Val Ser Gly Ser Trp Lys Asp Thr	
115 120 125	
atc ctt tat gag atc ccc tta ctg tcc cta ata tca gaa gcg tat ttt	432
Ile Leu Tyr Glu Ile Pro Leu Leu Ser Leu Ile Ser Glu Ala Tyr Phe	
130 135 140	
aaa ttt gtt gac atc gac tgg gac tac gaa aac caa tta gaa caa gct	480
Lys Phe Val Asp Ile Asp Trp Asp Tyr Glu Asn Gln Leu Glu Gln Ala	
145 150 155 160	
gag aag aag gcg gaa act ttg ttt gat aat ggt att aga ttc agt gaa	528

10

20

30

Glu Lys Lys Ala Glu Thr Leu Phe Asp Asn Gly Ile Arg Phe Ser Glu	
165 170 175	
ttt ggt aca aga cgt cgt aga tct ctg aag gct caa gat cta att atg	576
Phe Gly Thr Arg Arg Arg Arg Ser Leu Lys Ala Gln Asp Leu Ile Met	
180 185 190	
caa gga atc atg aaa gct gtg aac ggt aac cca gac aga aac aaa tcg	624
Gln Gly Ile Met Lys Ala Val Asn Gly Asn Pro Asp Arg Asn Lys Ser	
195 200 205	
cta tta tta ggc aca tca aat att tta ttt gcc aag aaa tat gga gtc	672
Leu Leu Leu Gly Thr Ser Asn Ile Leu Phe Ala Lys Lys Tyr Gly Val	
210 215 220	
aag cca atc ggt act gtg gct cac gag tgg gtt atg gga gtc gct tct	720
Lys Pro Ile Gly Thr Val Ala His Glu Trp Val Met Gly Val Ala Ser	
225 230 235 240	
att agt gaa gat tat ttg cat gcc aat aaa aat gca atg gat tgt tgg	768
Ile Ser Glu Asp Tyr Leu His Ala Asn Lys Asn Ala Met Asp Cys Trp	
245 250 255	
atc aat act ttt ggt gca aaa aat gct ggt tta gca tta acg gat act	816
Ile Asn Thr Phe Gly Ala Lys Asn Ala Gly Leu Ala Leu Thr Asp Thr	
260 265 270	
ttt gga act gat gac ttt tta aaa tca ttc cgt cca cca tat tct gat	864
Phe Gly Thr Asp Asp Phe Leu Lys Ser Phe Arg Pro Pro Tyr Ser Asp	
275 280 285	
gct tac gtc ggt gtt aga caa gat tct gga gac cca gtt gag tat acc	912
Ala Tyr Val Gly Val Arg Gln Asp Ser Gly Asp Pro Val Glu Tyr Thr	
290 295 300	
aaa aag att tcc cac cat tac cat gac gtg ttg aaa ttg cct aaa ttc	960
Lys Lys Ile Ser His His Tyr His Asp Val Leu Lys Leu Pro Lys Phe	
305 310 315 320	
tcg aag att atc tgt tat tcc gat tct ttg aac gtc gaa aag gca ata	1008
Ser Lys Ile Ile Cys Tyr Ser Asp Ser Leu Asn Val Glu Lys Ala Ile	
325 330 335	
act tac tcc cat gca gct aaa gag aat gga atg cta gcc aca ttc ggt	1056
Thr Tyr Ser His Ala Ala Lys Glu Asn Gly Met Leu Ala Thr Phe Gly	
340 345 350	
att ggc aca aac ttt act aat gat ttt cgt aag aag tca gaa ccc cag	1104
Ile Gly Thr Asn Phe Thr Asn Asp Phe Arg Lys Lys Ser Glu Pro Gln	
355 360 365	
gtt aaa agt gag ccg tta aac atc gtt atc aaa cta tta gaa gta aat	1152
Val Lys Ser Glu Pro Leu Asn Ile Val Ile Lys Leu Leu Glu Val Asn	
370 375 380	
ggg aat cac gct atc aaa att tct gat aac tta ggt aaa aat atg gga	1200
Gly Asn His Ala Ile Lys Ile Ser Asp Asn Leu Gly Lys Asn Met Gly	

10

20

30

385 390 395 400

gat cct gcc act gtg aag aga gtg aaa gag gaa ttg gga tat act gaa 1248
 Asp Pro Ala Thr Val Lys Arg Val Lys Glu Glu Leu Gly Tyr Thr Glu
 405 410 415

cga agt tgg agt ggt gat aac gaa gcg cac aga tgg acc taa 1290
 Arg Ser Trp Ser Gly Asp Asn Glu Ala His Arg Trp Thr
 420 425

<210> 2
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> saccharomeces cerevisae
 <400> 2

10

Met Ser Glu Pro Val Ile Lys Ser Leu Leu Asp Thr Asp Met Tyr Lys
 1 5 10 15

Ile Thr Met His Ala Ala Val Phe Thr Asn Phe Pro Asp Val Thr Val
 20 25 30

Thr Tyr Lys Tyr Thr Asn Arg Ser Ser Gln Leu Thr Phe Asn Lys Glu
 35 40 45

Ala Ile Asn Trp Leu Lys Glu Gln Phe Ser Tyr Leu Gly Asn Leu Arg
 50 55 60

20

Phe Thr Glu Glu Glu Ile Glu Tyr Leu Lys Gln Glu Ile Pro Tyr Leu
 65 70 75 80

Pro Ser Ala Tyr Ile Lys Tyr Ile Ser Ser Ser Asn Tyr Lys Leu His
 85 90 95

Pro Glu Glu Gln Ile Ser Phe Thr Ser Glu Glu Ile Glu Gly Lys Pro
 100 105 110

Thr His Tyr Lys Leu Lys Ile Leu Val Ser Gly Ser Trp Lys Asp Thr
 115 120 125

30

Ile Leu Tyr Glu Ile Pro Leu Leu Ser Leu Ile Ser Glu Ala Tyr Phe
 130 135 140

Lys Phe Val Asp Ile Asp Trp Asp Tyr Glu Asn Gln Leu Glu Gln Ala
 145 150 155 160

Glu Lys Lys Ala Glu Thr Leu Phe Asp Asn Gly Ile Arg Phe Ser Glu
 165 170 175
 Phe Gly Thr Arg Arg Arg Arg Ser Leu Lys Ala Gln Asp Leu Ile Met
 180 185 190
 Gln Gly Ile Met Lys Ala Val Asn Gly Asn Pro Asp Arg Asn Lys Ser
 195 200 205
 Leu Leu Leu Gly Thr Ser Asn Ile Leu Phe Ala Lys Lys Tyr Gly Val
 210 215 220
 Lys Pro Ile Gly Thr Val Ala His Glu Trp Val Met Gly Val Ala Ser
 225 230 235 240
 Ile Ser Glu Asp Tyr Leu His Ala Asn Lys Asn Ala Met Asp Cys Trp
 245 250 255
 Ile Asn Thr Phe Gly Ala Lys Asn Ala Gly Leu Ala Leu Thr Asp Thr
 260 265 270
 Phe Gly Thr Asp Asp Phe Leu Lys Ser Phe Arg Pro Pro Tyr Ser Asp
 275 280 285
 Ala Tyr Val Gly Val Arg Gln Asp Ser Gly Asp Pro Val Glu Tyr Thr
 290 295 300
 Lys Lys Ile Ser His His Tyr His Asp Val Leu Lys Leu Pro Lys Phe
 305 310 315 320
 Ser Lys Ile Ile Cys Tyr Ser Asp Ser Leu Asn Val Glu Lys Ala Ile
 325 330 335
 Thr Tyr Ser His Ala Ala Lys Glu Asn Gly Met Leu Ala Thr Phe Gly
 340 345 350
 Ile Gly Thr Asn Phe Thr Asn Asp Phe Arg Lys Lys Ser Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Lys Ser Glu Pro Leu Asn Ile Val Ile Lys Leu Leu Glu Val Asn
 370 375 380
 Gly Asn His Ala Ile Lys Ile Ser Asp Asn Leu Gly Lys Asn Met Gly

10

20

30

385 390 395 400

Asp Pro Ala Thr Val Lys Arg Val Lys Glu Glu Leu Gly Tyr Thr Glu
 405 410 415

Arg Ser Trp Ser Gly Asp Asn Glu Ala His Arg Trp Thr
 420 425

<210> 3
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> saccharomycetes cerevisiae
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(651)
 <400> 3

10

atg aag act tta att gtt gtt gat atg caa aat gat ttt att tca cct 48
 Met Lys Thr Leu Ile Val Val Asp Met Gln Asn Asp Phe Ile Ser Pro
 1 5 10 15

tta ggt tcc ttg act gtt cca aaa ggt gag gaa tta atc aat cct atc 96
 Leu Gly Ser Leu Thr Val Pro Lys Gly Glu Glu Leu Ile Asn Pro Ile
 20 25 30

tcg gat ttg atg caa gat gct gat aga gac tgg cac agg att gtg gtc 144
 Ser Asp Leu Met Gln Asp Ala Asp Arg Asp Trp His Arg Ile Val Val
 35 40 45

20

acc aga gat tgg cac cct tcc aga cat att tcg ttc gca aag aac cat 192
 Thr Arg Asp Trp His Pro Ser Arg His Ile Ser Phe Ala Lys Asn His
 50 55 60

aaa gat aaa gaa ccc tat tca aca tac acc tac cac tct cca agg cca 240
 Lys Asp Lys Glu Pro Tyr Ser Thr Tyr Thr Tyr His Ser Pro Arg Pro
 65 70 75 80

ggc gat gat tcc acg caa gag ggt att ttg tgg ccc gta cac tgt gtg 288
 Gly Asp Asp Ser Thr Gln Glu Gly Ile Leu Trp Pro Val His Cys Val
 85 90 95

aaa aac acc tgg ggt agt caa ttg gtt gac caa ata atg gac caa gtg 336
 Lys Asn Thr Trp Gly Ser Gln Leu Val Asp Gln Ile Met Asp Gln Val
 100 105 110

30

gtc act aag cat att aag att gtc gac aag ggt ttc ttg act gac cgt 384
 Val Thr Lys His Ile Lys Ile Val Asp Lys Gly Phe Leu Thr Asp Arg
 115 120 125

gaa tac tac tcc gcc ttc cac gac atc tgg aac ttc cat aag acc gac 432
 Glu Tyr Tyr Ser Ala Phe His Asp Ile Trp Asn Phe His Lys Thr Asp
 130 135 140

atg aac aag tac tta gaa aag cat cat aca gac gag gtt tac att gtc 480
 Met Asn Lys Tyr Leu Glu Lys His His Thr Asp Glu Val Tyr Ile Val
 145 150 155 160
 ggt gta gct ttg gag tat tgt gtc aaa gcc acc gcc att tcc gct gca 528
 Gly Val Ala Leu Glu Tyr Cys Val Lys Ala Thr Ala Ile Ser Ala Ala
 165 170 175
 gaa cta ggt tat aag acc act gtc ctg ctg gat tac aca aga ccc atc 576
 Glu Leu Gly Tyr Lys Thr Thr Val Leu Leu Asp Tyr Thr Arg Pro Ile
 180 185 190
 agc gat gat ccc gaa gtc atc aat aag gtt aag gaa gag ttg aag gcc 624
 Ser Asp Asp Pro Glu Val Ile Asn Lys Val Lys Glu Glu Leu Lys Ala
 195 200 205
 cac aac atc aat gtc gtg gat aaa taa 651
 His Asn Ile Asn Val Val Asp Lys
 210 215

10

<210> 4
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> saccharomycetes cerevisiae
 <400> 4

Met Lys Thr Leu Ile Val Val Asp Met Gln Asn Asp Phe Ile Ser Pro
 1 5 10 15

20

Leu Gly Ser Leu Thr Val Pro Lys Gly Glu Glu Leu Ile Asn Pro Ile
 20 25 30

Ser Asp Leu Met Gln Asp Ala Asp Arg Asp Trp His Arg Ile Val Val
 35 40 45

Thr Arg Asp Trp His Pro Ser Arg His Ile Ser Phe Ala Lys Asn His
 50 55 60

Lys Asp Lys Glu Pro Tyr Ser Thr Tyr Thr Tyr His Ser Pro Arg Pro
 65 70 75 80

30

Gly Asp Asp Ser Thr Gln Glu Gly Ile Leu Trp Pro Val His Cys Val
 85 90 95

Lys Asn Thr Trp Gly Ser Gln Leu Val Asp Gln Ile Met Asp Gln Val
 100 105 110

Val Thr Lys His Ile Lys Ile Val Asp Lys Gly Phe Leu Thr Asp Arg

115

120

125

Glu Tyr Tyr Ser Ala Phe His Asp Ile Trp Asn Phe His Lys Thr Asp
 130 135 140

Met Asn Lys Tyr Leu Glu Lys His His Thr Asp Glu Val Tyr Ile Val
 145 150 155 160

Gly Val Ala Leu Glu Tyr Cys Val Lys Ala Thr Ala Ile Ser Ala Ala
 165 170 175

Glu Leu Gly Tyr Lys Thr Thr Val Leu Leu Asp Tyr Thr Arg Pro Ile
 180 185 190

Ser Asp Asp Pro Glu Val Ile Asn Lys Val Lys Glu Glu Leu Lys Ala
 195 200 205

His Asn Ile Asn Val Val Asp Lys
 210 215

10

<210> 5
 <211> 1206
 <212> DNA
 <213> *saccharomycetes cerevisiae*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1206)
 <400> 5

20

atg gat ccc aca aga gct ccg gat ttc aaa ccg cca tct gca gac gag 48
 Met Asp Pro Thr Arg Ala Pro Asp Phe Lys Pro Pro Ser Ala Asp Glu
 1 5 10 15

gaa ttg att cct cca ccc gac ccg gaa tct aaa att ccc aaa tct att 96
 Glu Leu Ile Pro Pro Pro Asp Pro Glu Ser Lys Ile Pro Lys Ser Ile
 20 25 30

cca att att cca tac gtc tta gcc gat gcg aat tcc tct ata gat gca 144
 Pro Ile Ile Pro Tyr Val Leu Ala Asp Ala Asn Ser Ser Ile Asp Ala
 35 40 45

30

cct ttt aat att aag agg aag aaa aag cat cct aag cat cat cat cac 192
 Pro Phe Asn Ile Lys Arg Lys Lys Lys His Pro Lys His His His His
 50 55 60

cat cat cac agt cgt aaa gaa ggc aat gat aaa aaa cat cag cat att 240
 His His His Ser Arg Lys Glu Gly Asn Asp Lys Lys His Gln His Ile
 65 70 75 80

cca ttg aac caa gac gac ttt caa cca ctt tcc gca gaa gtg tct tcc	288
Pro Leu Asn Gln Asp Asp Phe Gln Pro Leu Ser Ala Glu Val Ser Ser	
85 90 95	
gaa gat gat gac gcg gat ttt aga tcc aag gag aga tac ggt tca gat	336
Glu Asp Asp Asp Ala Asp Phe Arg Ser Lys Glu Arg Tyr Gly Ser Asp	
100 105 110	
tca acc aca gaa tca gaa act aga ggt gtt cag aaa tat cag att gct	384
Ser Thr Thr Glu Ser Glu Thr Arg Gly Val Gln Lys Tyr Gln Ile Ala	
115 120 125	
gat tta gaa gaa gtt cca cat gga atc gtt cgt caa gca aga acc ttg	432
Asp Leu Glu Glu Val Pro His Gly Ile Val Arg Gln Ala Arg Thr Leu	
130 135 140	
gaa gac tac gaa ttc ccc tca cac aga tta tgc aaa aaa tta ctg gat	480
Glu Asp Tyr Glu Phe Pro Ser His Arg Leu Ser Lys Lys Leu Leu Asp	
145 150 155 160	
cca aat aaa ctg ccg tta gta ata gta gca tgt ggg tct ttt tca cca	528
Pro Asn Lys Leu Pro Leu Val Ile Val Ala Cys Gly Ser Phe Ser Pro	
165 170 175	
atc acc tac ttg cat cta aga atg ttt gaa atg gct tta gat gca atc	576
Ile Thr Tyr Leu His Leu Arg Met Phe Glu Met Ala Leu Asp Ala Ile	
180 185 190	
tct gaa caa aca agg ttt gaa gtc ata ggt gga tat tac tcc cot gtt	624
Ser Glu Gln Thr Arg Phe Glu Val Ile Gly Gly Tyr Tyr Ser Pro Val	
195 200 205	
agt gat aac tat caa aag caa ggc ttg gcc cca tcc tac cat aga gta	672
Ser Asp Asn Tyr Gln Lys Gln Gly Leu Ala Pro Ser Tyr His Arg Val	
210 215 220	
cgt atg tgt gaa ttg gcc tgc gaa aga acc tca tct tgg ttg atg gtg	720
Arg Met Cys Glu Leu Ala Cys Glu Arg Thr Ser Ser Trp Leu Met Val	
225 230 235 240	
gat gca tgg gag tca ttg caa cct tca tac aca aga act gcc aag gtc	768
Asp Ala Trp Glu Ser Leu Gln Pro Ser Tyr Thr Arg Thr Ala Lys Val	
245 250 255	
ttg gat cat ttc aat cac gaa atc aat att aag aga ggt ggt gta gct	816
Leu Asp His Phe Asn His Glu Ile Asn Ile Lys Arg Gly Gly Val Ala	
260 265 270	
act gtt act gga gaa aaa att ggt gtg aaa ata atg ttg ctg gct ggt	864
Thr Val Thr Gly Glu Lys Ile Gly Val Lys Ile Met Leu Leu Ala Gly	
275 280 285	
ggg gac cta ata gag tca atg ggt gaa cca aac gtt tgg gcg gac gcc	912
Gly Asp Leu Ile Glu Ser Met Gly Glu Pro Asn Val Trp Ala Asp Ala	
290 295 300	
gat tta cat cac att ctc ggt aat tac ggt tgt ttg att gtc gaa cgt	960

10

20

30

Asp Leu His His Ile Leu Gly Asn Tyr Gly Cys Leu Ile Val Glu Arg
 305 310 315 320
 act ggt tct gat gta agg tct ttt ttg tta tcc cat gat att atg tat 1008
 Thr Gly Ser Asp Val Arg Ser Phe Leu Leu Ser His Asp Ile Met Tyr
 325 330 335
 gaa cat aga agg aat att ctt atc atc aag caa ctc atc tat aat gat 1056
 Glu His Arg Arg Asn Ile Leu Ile Ile Lys Gln Leu Ile Tyr Asn Asp
 340 345 350
 att tct tcc acg aaa gtt cgt cta ttt atc aga cgc gcc atg tct gta 1104
 Ile Ser Ser Thr Lys Val Arg Leu Phe Ile Arg Arg Ala Met Ser Val
 355 360 365
 caa tat ttg tta cct aat tct gtc atc agg tat atc caa gaa cat aga 1152
 Gln Tyr Leu Leu Pro Asn Ser Val Ile Arg Tyr Ile Gln Glu His Arg
 370 375 380
 cta tat gtg gac caa acc gaa cct gtt aag caa gtt ctt gga aac aaa 1200
 Leu Tyr Val Asp Gln Thr Glu Pro Val Lys Gln Val Leu Gly Asn Lys
 385 390 395 400
 gaa tga 1206
 Glu

10

<210> 6
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> *saccharomycetes cerevisiae*
 <400> 6

20

Met Asp Pro Thr Arg Ala Pro Asp Phe Lys Pro Pro Ser Ala Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Ile Pro Pro Asp Pro Glu Ser Lys Ile Pro Lys Ser Ile
 20 25 30
 Pro Ile Ile Pro Tyr Val Leu Ala Asp Ala Asn Ser Ser Ile Asp Ala
 35 40 45
 Pro Phe Asn Ile Lys Arg Lys Lys Lys His Pro Lys His His His His
 50 55 60
 His His His Ser Arg Lys Glu Gly Asn Asp Lys Lys His Gln His Ile
 65 70 75 80
 Pro Leu Asn Gln Asp Asp Phe Gln Pro Leu Ser Ala Glu Val Ser Ser
 85 90 95

30

Glu Asp Asp Asp Ala Asp Phe Arg Ser Lys Glu Arg Tyr Gly Ser Asp
 100 105 110

Ser Thr Thr Glu Ser Glu Thr Arg Gly Val Gln Lys Tyr Gln Ile Ala
 115 120 125

Asp Leu Glu Glu Val Pro His Gly Ile Val Arg Gln Ala Arg Thr Leu
 130 135 140

Glu Asp Tyr Glu Phe Pro Ser His Arg Leu Ser Lys Lys Leu Leu Asp
 145 150 155 160

Pro Asn Lys Leu Pro Leu Val Ile Val Ala Cys Gly Ser Phe Ser Pro
 165 170 175

Ile Thr Tyr Leu His Leu Arg Met Phe Glu Met Ala Leu Asp Ala Ile
 180 185 190

Ser Glu Gln Thr Arg Phe Glu Val Ile Gly Gly Tyr Tyr Ser Pro Val
 195 200 205

Ser Asp Asn Tyr Gln Lys Gln Gly Leu Ala Pro Ser Tyr His Arg Val
 210 215 220

Arg Met Cys Glu Leu Ala Cys Glu Arg Thr Ser Ser Trp Leu Met Val
 225 230 235 240

Asp Ala Trp Glu Ser Leu Gln Pro Ser Tyr Thr Arg Thr Ala Lys Val
 245 250 255

Leu Asp His Phe Asn His Glu Ile Asn Ile Lys Arg Gly Gly Val Ala
 260 265 270

Thr Val Thr Gly Glu Lys Ile Gly Val Lys Ile Met Leu Leu Ala Gly
 275 280 285

Gly Asp Leu Ile Glu Ser Met Gly Glu Pro Asn Val Trp Ala Asp Ala
 290 295 300

Asp Leu His His Ile Leu Gly Asn Tyr Gly Cys Leu Ile Val Glu Arg
 305 310 315 320

10

20

30

Thr Gly Ser Asp Val Arg Ser Phe Leu Leu Ser His Asp Ile Met Tyr
 325 330 335

Glu His Arg Arg Asn Ile Leu Ile Ile Lys Gln Leu Ile Tyr Asn Asp
 340 345 350

Ile Ser Ser Thr Lys Val Arg Leu Phe Ile Arg Arg Ala Met Ser Val
 355 360 365

Gln Tyr Leu Leu Pro Asn Ser Val Ile Arg Tyr Ile Gln Glu His Arg
 370 375 380

Leu Tyr Val Asp Gln Thr Glu Pro Val Lys Gln Val Leu Gly Asn Lys
 385 390 395 400

Glu

<210> 7
 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> saccharomycetes cerevisiae
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1188)
 <400> 7

atg gat ccc acc aaa gca ccc gat ttt aaa ccg cca cag cca aat gaa 48
 Met Asp Pro Thr Lys Ala Pro Asp Phe Lys Pro Pro Gln Pro Asn Glu
 1 5 10 15

gaa cta caa cca ccg cca gat cca aca cat acg ata cca aaa tct gga 96
 Glu Leu Gln Pro Pro Asp Pro Thr His Thr Ile Pro Lys Ser Gly
 20 25 30

ccc ata gtt cca tat gtt tta gct gat tat aat tct tcg atc gat gct 144
 Pro Ile Val Pro Tyr Val Leu Ala Asp Tyr Asn Ser Ser Ile Asp Ala
 35 40 45

cct ttc aat ctc gac att tac aaa acc ctg tcg tca agg aaa aaa aac 192
 Pro Phe Asn Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Leu Ser Ser Arg Lys Lys Asn
 50 55 60

gcc aac tca agc aac cga atg gac cat att cca tta aat act agt gac 240
 Ala Asn Ser Ser Asn Arg Met Asp His Ile Pro Leu Asn Thr Ser Asp
 65 70 75 80

ttc cag cca cta tct cgg gat gta tca tcg gag gag gaa agt gaa ggg 288
 Phe Gln Pro Leu Ser Arg Asp Val Ser Ser Glu Glu Glu Ser Glu Gly

10

20

30

85	90	95		
caa tcg aat gga att gac gct act cta cag gat gtt acg atg act ggg			336	
Gln Ser Asn Gly Ile Asp Ala Thr Leu Gln Asp Val Thr Met Thr Gly				
100	105	110		
aat ttg ggg gta ctg aag agc caa att gct gat ttg gaa gaa gtt cct			384	
Asn Leu Gly Val Leu Lys Ser Gln Ile Ala Asp Leu Glu Glu Val Pro				
115	120	125		
cac aca att gta aga caa gcc aga act att gaa gat tac gaa ttt cct			432	
His Thr Ile Val Arg Gln Ala Arg Thr Ile Glu Asp Tyr Glu Phe Pro				
130	135	140		
gta cac aga ttg acg aaa aag tta caa gat cct gaa aaa ctg cct ctg			480	
Val His Arg Leu Thr Lys Lys Leu Gln Asp Pro Glu Lys Leu Pro Leu				10
145	150	155		
atc atc gtt gct tgt gga tca ttt tct ccc ata aca tac cta cat ttg			528	
Ile Ile Val Ala Cys Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Leu His Leu				
165	170	175		
aga atg ttt gaa atg gct tta gat gat atc aat gag caa acg cgt ttt			576	
Arg Met Phe Glu Met Ala Leu Asp Asp Ile Asn Glu Gln Thr Arg Phe				
180	185	190		
gaa gtg gtt ggt ggt tat ttt tct cca gta agt gat aac tat caa aag			624	
Glu Val Val Gly Gly Tyr Phe Ser Pro Val Ser Asp Asn Tyr Gln Lys				
195	200	205		
cga ggg tta gcc cca gct tat cat cgt gtc cgc atg tgc gaa tta gca			672	
Arg Gly Leu Ala Pro Ala Tyr His Arg Val Arg Met Cys Glu Leu Ala				20
210	215	220		
tgc gag cgg aca tca tct tgg tta atg gtt gat gcc tgg gaa tct tta			720	
Cys Glu Arg Thr Ser Trp Leu Met Val Asp Ala Trp Glu Ser Leu				
225	230	235		
caa tca agt tat aca agg aca gca aaa gtc ttg gac cat ttc aat cat			768	
Gln Ser Ser Tyr Thr Arg Thr Ala Lys Val Leu Asp His Phe Asn His				
245	250	255		
gaa ata aat atc aag aga ggt gga atc atg act gta gat ggt gaa aaa			816	
Glu Ile Asn Ile Lys Arg Gly Gly Ile Met Thr Val Asp Gly Glu Lys				
260	265	270		
atg ggc gta aaa atc atg tta ttg gca ggc ggt gat ctt atc gaa tcc			864	
Met Gly Val Lys Ile Met Leu Leu Ala Gly Gly Asp Leu Ile Glu Ser				30
275	280	285		
atg ggc gag cct cat gtg tgg gct gat tca gac ctg cac cat att ttg			912	
Met Gly Glu Pro His Val Trp Ala Asp Ser Asp Leu His His Ile Leu				
290	295	300		
ggg aat tat gga tgt ttg atc gtg gaa agg act ggt tct gat gtt agg			960	
Gly Asn Tyr Gly Cys Leu Ile Val Glu Arg Thr Gly Ser Asp Val Arg				
305	310	315		
				320

tcc ttc ttg ctt tcc cat gat atc atg tat gaa cac aga aga aat atc 1008
 Ser Phe Leu Leu Ser His Asp Ile Met Tyr Glu His Arg Arg Asn Ile
 325 330 335
 ctt att atc aaa caa ctt att tac aat gat att tcc tct acg aaa gtg 1056
 Leu Ile Ile Lys Gln Leu Ile Tyr Asn Asp Ile Ser Ser Thr Lys Val
 340 345 350
 cgg ctt ttc atc aga cgt gga atg tca gtt caa tat ctt ctt cca aac 1104
 Arg Leu Phe Ile Arg Arg Gly Met Ser Val Gln Tyr Leu Leu Pro Asn
 355 360 365
 tct gtc atc cgt tac atc caa gag tat aat cta tac att aat caa agt 1152
 Ser Val Ile Arg Tyr Ile Gln Glu Tyr Asn Leu Tyr Ile Asn Gln Ser
 370 375 380
 gaa ccg gtc aag cag gtc ttg gat agc aaa gag tga 1188
 Glu Pro Val Lys Gln Val Leu Asp Ser Lys Glu
 385 390 395

10

<210> 8
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> saccharomycetes cerevisiae
 <400> 8

Met Asp Pro Thr Lys Ala Pro Asp Phe Lys Pro Pro Gln Pro Asn Glu
 1 5 10 15

20

Glu Leu Gln Pro Pro Pro Asp Pro Thr His Thr Ile Pro Lys Ser Gly
 20 25 30

Pro Ile Val Pro Tyr Val Leu Ala Asp Tyr Asn Ser Ser Ile Asp Ala
 35 40 45

Pro Phe Asn Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Leu Ser Ser Arg Lys Lys Asn
 50 55 60

Ala Asn Ser Ser Asn Arg Met Asp His Ile Pro Leu Asn Thr Ser Asp
 65 70 75 80

30

Phe Gln Pro Leu Ser Arg Asp Val Ser Ser Glu Glu Glu Ser Glu Gly
 85 90 95

Gln Ser Asn Gly Ile Asp Ala Thr Leu Gln Asp Val Thr Met Thr Gly
 100 105 110

Asn Leu Gly Val Leu Lys Ser Gln Ile Ala Asp Leu Glu Glu Val Pro
 115 120 125
 His Thr Ile Val Arg Gln Ala Arg Thr Ile Glu Asp Tyr Glu Phe Pro
 130 135 140
 Val His Arg Leu Thr Lys Lys Leu Gln Asp Pro Glu Lys Leu Pro Leu
 145 150 155 160
 Ile Ile Val Ala Cys Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Leu His Leu
 165 170 175
 Arg Met Phe Glu Met Ala Leu Asp Asp Ile Asn Glu Gln Thr Arg Phe
 180 185 190
 Glu Val Val Gly Gly Tyr Phe Ser Pro Val Ser Asp Asn Tyr Gln Lys
 195 200 205
 Arg Gly Leu Ala Pro Ala Tyr His Arg Val Arg Met Cys Glu Leu Ala
 210 215 220
 Cys Glu Arg Thr Ser Ser Trp Leu Met Val Asp Ala Trp Glu Ser Leu
 225 230 235 240
 Gln Ser Ser Tyr Thr Arg Thr Ala Lys Val Leu Asp His Phe Asn His
 245 250 255
 Glu Ile Asn Ile Lys Arg Gly Gly Ile Met Thr Val Asp Gly Glu Lys
 260 265 270
 Met Gly Val Lys Ile Met Leu Leu Ala Gly Gly Asp Leu Ile Glu Ser
 275 280 285
 Met Gly Glu Pro His Val Trp Ala Asp Ser Asp Leu His His Ile Leu
 290 295 300
 Gly Asn Tyr Gly Cys Leu Ile Val Glu Arg Thr Gly Ser Asp Val Arg
 305 310 315 320
 Ser Phe Leu Leu Ser His Asp Ile Met Tyr Glu His Arg Arg Asn Ile
 325 330 335
 Leu Ile Ile Lys Gln Leu Ile Tyr Asn Asp Ile Ser Ser Thr Lys Val

10

20

30

340

345

350

Arg Leu Phe Ile Arg Arg Gly Met Ser Val Gln Tyr Leu Leu Pro Asn
 355 360 365

Ser Val Ile Arg Tyr Ile Gln Glu Tyr Asn Leu Tyr Ile Asn Gln Ser
 370 375 380

Glu Pro Val Lys Gln Val Leu Asp Ser Lys Glu
 385 390 395

<210> 9
 <211> 952
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (118)..(912)
 <400> 9

10

tgaactctgg atgctgttag cctgagactc aggaagacaa cttctgcagg gtcactccct 60

ggcttctgga ggaaagagaa ggagggcagt gctccagtgg tacagaagtg agacata 117

atg gaa tca ggc ttc acc tcc aag gac acc tat cta agc cat ttt aac 165
 Met Glu Ser Gly Phe Thr Ser Lys Asp Thr Tyr Leu Ser His Phe Asn
 1 5 10 15

20

cct cgg gat tac cta gaa aaa tat tac aag ttt ggt tct agg cac tct 213
 Pro Arg Asp Tyr Leu Glu Lys Tyr Tyr Lys Phe Gly Ser Arg His Ser
 20 25 30

gca gaa agc cag att ctt aag cac ctt ctg aaa aat ctt ttc aag ata 261
 Ala Glu Ser Gln Ile Leu Lys His Leu Leu Lys Asn Leu Phe Lys Ile
 35 40 45

ttc tgc cta gac ggt gtg aag gga gac ctg ctg att gac atc ggc tct 309
 Phe Cys Leu Asp Gly Val Lys Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ile Gly Ser
 50 55 60

ggc ccc act atc tat cag ctc ctc tct gct tgt gaa tcc ttt aag gag 357
 Gly Pro Thr Ile Tyr Gln Leu Leu Ser Ala Cys Glu Ser Phe Lys Glu
 65 70 75 80

30

atc gtc gtc act gac tac tca gac cag aac ctg cag gag ctg gag aag 405
 Ile Val Val Thr Asp Tyr Ser Asp Gln Asn Leu Gln Glu Leu Glu Lys
 85 90 95

tgg ctg aag aaa gag cca gag gcc ttt gac tgg tcc cca gtg gtg acc 453
 Trp Leu Lys Lys Glu Pro Glu Ala Phe Asp Trp Ser Pro Val Val Thr
 100 105 110

tat gtg tgt gat ctt gaa ggg aac aga gtc aag ggt cca gag aag gag 501
 Tyr Val Cys Asp Leu Glu Gly Asn Arg Val Lys Gly Pro Glu Lys Glu
 115 120 125

gag aag ttg aga cag gcg gtc aag cag gtg ctg aag tgt gat gtg act 549
 Glu Lys Leu Arg Gln Ala Val Lys Gln Val Leu Lys Cys Asp Val Thr
 130 135 140

cag agc cag cca ctg ggg gcc gtc ccc tta ccc ccg gct gac tgc gtg 597
 Gln Ser Gln Pro Leu Gly Ala Val Pro Leu Pro Pro Ala Asp Cys Val
 145 150 155 160

ctc agc aca ctg tgt ctg gat gcc gcc tgc cca gac ctc ccc acc tac 645
 Leu Ser Thr Leu Cys Leu Asp Ala Ala Cys Pro Asp Leu Pro Thr Tyr
 165 170 175

tgc agg gcg ctc agg aac ctc ggc agc cta ctg aag cca ggg ggc ttc 693
 Cys Arg Ala Leu Arg Asn Leu Gly Ser Leu Leu Lys Pro Gly Gly Phe
 180 185 190

ctg gtg atc atg gat gcg ctc aag agc agc tac tac atg att ggt gag 741
 Leu Val Ile Met Asp Ala Leu Lys Ser Ser Tyr Tyr Met Ile Gly Glu
 195 200 205

cag aag ttc tcc agc ctc ccc ctg ggc cgg gag gca gta gag gct gct 789
 Gln Lys Phe Ser Ser Leu Pro Leu Gly Arg Glu Ala Val Glu Ala Ala
 210 215 220

gtg aaa gag gct ggc tac aca atc gaa tgg ttt gag gtg atc tcg caa 837
 Val Lys Glu Ala Gly Tyr Thr Ile Glu Trp Phe Glu Val Ile Ser Gln
 225 230 235 240

agt tat tct tcc acc atg gcc aac aac gaa gga ctt ttc tcc ctg gtg 885
 Ser Tyr Ser Ser Thr Met Ala Asn Asn Glu Gly Leu Phe Ser Leu Val
 245 250 255

gcg agg aag ctg agc aga ccc ctg tga tgccctgtgac ctcaattaaa 932
 Ala Arg Lys Leu Ser Arg Pro Leu
 260

gcaattcctt tgacctgtca 952

10

20

30

<210> 10
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 10

Met Glu Ser Gly Phe Thr Ser Lys Asp Thr Tyr Leu Ser His Phe Asn
 1 5 10 15

Pro Arg Asp Tyr Leu Glu Lys Tyr Tyr Lys Phe Gly Ser Arg His Ser
 20 25 30

Ala Glu Ser Gln Ile Leu Lys His Leu Leu Lys Asn Leu Phe Lys Ile
 35 40 45
 Phe Cys Leu Asp Gly Val Lys Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ile Gly Ser
 50 55 60
 Gly Pro Thr Ile Tyr Gln Leu Leu Ser Ala Cys Glu Ser Phe Lys Glu
 65 70 75 80
 Ile Val Val Thr Asp Tyr Ser Asp Gln Asn Leu Gln Glu Leu Glu Lys
 85 90 95
 Trp Leu Lys Lys Glu Pro Glu Ala Phe Asp Trp Ser Pro Val Val Thr
 100 105 110
 Tyr Val Cys Asp Leu Glu Gly Asn Arg Val Lys Gly Pro Glu Lys Glu
 115 120 125
 Glu Lys Leu Arg Gln Ala Val Lys Gln Val Leu Lys Cys Asp Val Thr
 130 135 140
 Gln Ser Gln Pro Leu Gly Ala Val Pro Leu Pro Pro Ala Asp Cys Val
 145 150 155 160
 Leu Ser Thr Leu Cys Leu Asp Ala Ala Cys Pro Asp Leu Pro Thr Tyr
 165 170 175
 Cys Arg Ala Leu Arg Asn Leu Gly Ser Leu Leu Lys Pro Gly Gly Phe
 180 185 190
 Leu Val Ile Met Asp Ala Leu Lys Ser Ser Tyr Tyr Met Ile Gly Glu
 195 200 205
 Gln Lys Phe Ser Ser Leu Pro Leu Gly Arg Glu Ala Val Glu Ala Ala
 210 215 220
 Val Lys Glu Ala Gly Tyr Thr Ile Glu Trp Phe Glu Val Ile Ser Gln
 225 230 235 240
 Ser Tyr Ser Ser Thr Met Ala Asn Asn Glu Gly Leu Phe Ser Leu Val
 245 250 255

10

20

30

Ala Arg Lys Leu Ser Arg Pro Leu
260

<210> 11
<211> 1240
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (38)..(1144)
<400> 11

gagctcgcag cgcgcggccc ctgtcctccg gcccgag atg aat cct gcg gca gaa 55
Met Asn Pro Ala Ala Glu
1 5

10

gcc gag ttc aac atc ctc ctg gcc acc gac tcc tac aag gtt act cac 103
Ala Glu Phe Asn Ile Leu Leu Ala Thr Asp Ser Tyr Lys Val Thr His
10 15 20

tat aaa caa tat cca ccc aac aca agc aaa gtt tat tcc tac ttt gaa 151
Tyr Lys Gln Tyr Pro Pro Asn Thr Ser Lys Val Tyr Ser Tyr Phe Glu
25 30 35

tgc cgt gaa aag aag aca gaa aac tcc aaa tta agg aag gtg aaa tat 199
Cys Arg Glu Lys Lys Thr Glu Asn Ser Lys Leu Arg Lys Val Lys Tyr
40 45 50

gag gaa aca gta ttt tat ggg ttg cag tac att ctt aat aag tac tta 247
Glu Glu Thr Val Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr Ile Leu Asn Lys Tyr Leu
55 60 65 70

20

aaa ggt aaa gta gta acc aaa gag aaa atc cag gaa gcc aaa gat gtc 295
Lys Gly Lys Val Thr Lys Glu Lys Ile Gln Glu Ala Lys Asp Val
75 80 85

tac aaa gaa cat ttc caa gat gat gtc ttt aat gaa aag gga tgg aac 343
Tyr Lys Glu His Phe Gln Asp Asp Val Phe Asn Glu Lys Gly Trp Asn
90 95 100

tac att ctt gag aag tat gat ggg cat ctt cca ata gaa ata aaa gct 391
Tyr Ile Leu Glu Lys Tyr Asp Gly His Leu Pro Ile Glu Ile Lys Ala
105 110 115

gtt cct gag ggc ttt gtc att ccc aga gga aat gtt ctc ttc acg gtg 439
Val Pro Glu Gly Phe Val Ile Pro Arg Gly Asn Val Leu Phe Thr Val
120 125 130

30

gaa aac aca gat cca gag tgt tac tgg ctt aca aat tgg att gag act 487
Glu Asn Thr Asp Pro Glu Cys Tyr Trp Leu Thr Asn Trp Ile Glu Thr
135 140 145 150

att ctt gtt cag tcc tgg tat cca atc aca gtg gcc aca aat tct aga 535
Ile Leu Val Gln Ser Trp Tyr Pro Ile Thr Val Ala Thr Asn Ser Arg
155 160 165

gag cag aag aaa ata ttg gcc aaa tat ttg tta gaa act tct ggt aac 583
 Glu Gln Lys Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Glu Thr Ser Gly Asn
 170 175 180

tta gat ggt ctg gaa tac aag tta cat gat ttt ggc tac aga gga gtc 631
 Leu Asp Gly Leu Glu Tyr Lys Leu His Asp Phe Gly Tyr Arg Gly Val
 185 190 195

tct tcc caa gag act gct ggc ata gga gca tct gct cac ttg gtt aac 679
 Ser Ser Gln Glu Thr Ala Gly Ile Gly Ala Ser Ala His Leu Val Asn
 200 205 210

ttc aaa gga aca gat aca gta gca gga ctt gct cta att aaa aaa tat 727
 Phe Lys Gly Thr Asp Thr Val Ala Gly Leu Ala Leu Ile Lys Lys Tyr
 215 220 225 230

tat gga acg aaa gat cct gtt cca ggc tat tct gtt cca gca gca gaa 775
 Tyr Gly Thr Lys Asp Pro Val Pro Gly Tyr Ser Val Pro Ala Ala Glu
 235 240 245

cac agt acc ata aca gct tgg ggg aaa gac cat gaa aaa gat gct ttt 823
 His Ser Thr Ile Thr Ala Trp Gly Lys Asp His Glu Lys Asp Ala Phe
 250 255 260

gaa cat att gta aca cag ttt tca tca gtg cct gta tct gtg gtc agc 871
 Glu His Ile Val Thr Gln Phe Ser Ser Val Pro Val Ser Val Val Ser
 265 270 275

gat agc tat gac att tat aat gcg tgt gag aaa ata tgg ggt gaa gat 919
 Asp Ser Tyr Asp Ile Tyr Asn Ala Cys Glu Lys Ile Trp Gly Glu Asp
 280 285 290

cta aga cat tta ata gta tcg aga agt aca cag gca cca cta ata atc 967
 Leu Arg His Leu Ile Val Ser Arg Ser Thr Gln Ala Pro Leu Ile Ile
 295 300 305 310

aga cct gat tct gga aac cct ctt gac act gtg tta aag gtt ttg gag 1015
 Arg Pro Asp Ser Gly Asn Pro Leu Asp Thr Val Leu Lys Val Leu Glu
 315 320 325

att tta ggt aag aag ttt cct gtt act gag aac tca aag ggt tac aag 1063
 Ile Leu Gly Lys Lys Phe Pro Val Thr Glu Asn Ser Lys Gly Tyr Lys
 330 335 340

ttg ctg cca cct tat ctt aga gtt att caa ggg gat gga gta gat att 1111
 Leu Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Val Ile Gln Gly Asp Gly Val Asp Ile
 345 350 355

aat acc tta caa gag gta tgt gtt tta tat taa aagtttcaat aaggcatttc 1164
 Asn Thr Leu Gln Glu Val Cys Val Leu Tyr
 360 365

ttataattaa gtttgtttat gtttgataaa gaacacaata taaatacaaaa aaaaaaaaaa 1224
 aaaaaaaaaa aaaaaa 1240

10

20

30

<210> 12
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

Met Asn Pro Ala Ala Glu Ala Glu Phe Asn Ile Leu Leu Ala Thr Asp
 1 5 10 15

Ser Tyr Lys Val Thr His Tyr Lys Gln Tyr Pro Pro Asn Thr Ser Lys
 20 25 30

Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu Lys Lys Thr Glu Asn Ser Lys
 35 40 45

10

Leu Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr Val Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr
 50 55 60

Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val Val Thr Lys Glu Lys Ile
 65 70 75 80

Gln Glu Ala Lys Asp Val Tyr Lys Glu His Phe Gln Asp Asp Val Phe
 85 90 95

Asn Glu Lys Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu Lys Tyr Asp Gly His Leu
 100 105 110

20

Pro Ile Glu Ile Lys Ala Val Pro Glu Gly Phe Val Ile Pro Arg Gly
 115 120 125

Asn Val Leu Phe Thr Val Glu Asn Thr Asp Pro Glu Cys Tyr Trp Leu
 130 135 140

Thr Asn Trp Ile Glu Thr Ile Leu Val Gln Ser Trp Tyr Pro Ile Thr
 145 150 155 160

Val Ala Thr Asn Ser Arg Glu Gln Lys Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Leu
 165 170 175

30

Leu Glu Thr Ser Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Tyr Lys Leu His Asp
 180 185 190

Phe Gly Tyr Arg Gly Val Ser Ser Gln Glu Thr Ala Gly Ile Gly Ala

195

200

205

Ser Ala His Leu Val Asn Phe Lys Gly Thr Asp Thr Val Ala Gly Leu
 210 215 220

Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Tyr Gly Thr Lys Asp Pro Val Pro Gly Tyr
 225 230 235 240

Ser Val Pro Ala Ala Glu His Ser Thr Ile Thr Ala Trp Gly Lys Asp
 245 250 255

His Glu Lys Asp Ala Phe Glu His Ile Val Thr Gln Phe Ser Ser Val
 260 265 270

Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr Asp Ile Tyr Asn Ala Cys Glu
 275 280 285

Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His Leu Ile Val Ser Arg Ser Thr
 290 295 300

Gln Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp Ser Gly Asn Pro Leu Asp Thr
 305 310 315 320

Val Leu Lys Val Leu Glu Ile Leu Gly Lys Lys Phe Pro Val Thr Glu
 325 330 335

Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Val Ile Gln
 340 345 350

Gly Asp Gly Val Asp Ile Asn Thr Leu Gln Glu Val Cys Val Leu Tyr
 355 360 365

<210> 13
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(936)
 <400> 13

ccg atg ttg gcg cca gca gct ggt gag ggc cct ggg gtg gac ctg gcg
 Met Leu Ala Pro Ala Ala Gly Glu Gly Pro Gly Val Asp Leu Ala
 1 5 10 15

48

10

20

30

gcc aaa gcc cag gtg tgg ctg gag cag gtg tgt gcc cac ctg ggg ctg 96
 Ala Lys Ala Gln Val Trp Leu Glu Gln Val Cys Ala His Leu Gly Leu
 20 25 30

ggg gtg cag gag cca cat cca ggc gag cgg gca gcc ttt gtg gcc tat 144
 Gly Val Gln Ala Pro His Pro Gly Glu Arg Ala Ala Phe Val Ala Tyr
 35 40 45

gcc ttg gct ttt ccc cgg gcc ttc cag ggc ctc ctg gac acc tac agc 192
 Ala Leu Ala Phe Pro Arg Ala Phe Gln Gly Leu Leu Asp Thr Tyr Ser
 50 55 60

gtg tgg agg agt ggt ctc ccc aac ttc cta gca gtc gcc ttg gcc ctg 240
 Val Trp Arg Ser Gly Leu Pro Asn Phe Leu Ala Val Ala Leu Ala Leu
 65 70 75

gga gag ctg ggc tac cgg gca gtg ggc gtg agg ctg gac agt ggt gac 288
 Gly Glu Leu Gly Tyr Arg Ala Val Gly Val Arg Leu Asp Ser Gly Asp
 80 85 90 95

ctg cta cag cag gct cag gag atc cgc aag gtc ttc cga gct gct gca 336
 Leu Leu Gln Gln Ala Gln Glu Ile Arg Lys Val Phe Arg Ala Ala Ala
 100 105 110

gcc cag ttc cag gtg ccc tgg ctg gag tca gtc ctc atc gta gtc agc 384
 Ala Gln Phe Gln Val Pro Trp Leu Glu Ser Val Leu Ile Val Val Ser
 115 120 125

aac aac att gac gag gag gcg ctg gcc cga ctg gcc cag gag ggc agt 432
 Asn Asn Ile Asp Glu Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ala Gln Glu Gly Ser
 130 135 140

gag gtg aat gtc att ggc att ggc acc agt gtg gtc acc tgc ccc caa 480
 Glu Val Asn Val Ile Gly Ile Gly Thr Ser Val Val Thr Cys Pro Gln
 145 150 155

cag cct tcc ctg ggt ggc gtc tat aag ctg gtg gcc gtg ggg ggc cag 528
 Gln Pro Ser Leu Gly Gly Val Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Gly Gln
 160 165 170 175

cca cga atg aag ctg acc gag gac ccc gag aag cag acg ttg cct ggg 576
 Pro Arg Met Lys Leu Thr Glu Asp Pro Glu Lys Gln Thr Leu Pro Gly
 180 185 190

agc aag gct gct ttc cgg ctc ctg ggc tct gac ggg tct cca ctc atg 624
 Ser Lys Ala Ala Phe Arg Leu Leu Gly Ser Asp Gly Ser Pro Leu Met
 195 200 205

gac atg ctg cag tta gca gaa gag cca gtg cca cag gct ggg cag gag 672
 Asp Met Leu Gln Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Gln Ala Gly Gln Glu
 210 215 220

ctg agg gtg tgg cct cca ggg gcc cag gag ccc tgc acc gtg agg cca 720
 Leu Arg Val Trp Pro Pro Gly Ala Gln Glu Pro Cys Thr Val Arg Pro
 225 230 235

gcc cag gtg gag cca cta ctg cgg ctc tgc ctc cag cag gga cag ctg 768

10

20

30

Ala Gln Val Glu Pro Leu Leu Arg Leu Cys Leu Gln Gln Gly Gln Leu
 240 245 250 255

tgt gag ccg ctc cca tcc ctg gca gag tct aga gcc ttg gcc cag ctg 816
 Cys Glu Pro Leu Pro Ser Leu Ala Glu Ser Arg Ala Leu Ala Gln Leu
 260 265 270

tcc ctg agc cga ctc agc cct gag cac agg cgg ctg cgg agc cct gca 864
 Ser Leu Ser Arg Leu Ser Pro Glu His Arg Arg Leu Arg Ser Pro Ala
 275 280 285

cag tac cag gtg gtg ctg tcc gag agg ctg cag gcc ctg gtg aac agt 912
 Gln Tyr Gln Val Val Leu Ser Glu Arg Leu Gln Ala Leu Val Asn Ser
 290 295 300

ctg tgt gcg ggg cag tcc ccc tga gactcggagc ggggctgact ggaaacaaca 966
 Leu Cys Ala Gly Gln Ser Pro
 305 310

cgaatcactc acttttcccc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1011

10

<210> 14
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 14

Met Leu Ala Pro Ala Ala Gly Glu Gly Pro Gly Val Asp Leu Ala Ala
 1 5 10 15

20

Lys Ala Gln Val Trp Leu Glu Gln Val Cys Ala His Leu Gly Leu Gly
 20 25 30

Val Gln Glu Pro His Pro Gly Glu Arg Ala Ala Phe Val Ala Tyr Ala
 35 40 45

Leu Ala Phe Pro Arg Ala Phe Gln Gly Leu Leu Asp Thr Tyr Ser Val
 50 55 60

Trp Arg Ser Gly Leu Pro Asn Phe Leu Ala Val Ala Leu Ala Leu Gly
 65 70 75 80

30

Glu Leu Gly Tyr Arg Ala Val Gly Val Arg Leu Asp Ser Gly Asp Leu
 85 90 95

Leu Gln Gln Ala Gln Glu Ile Arg Lys Val Phe Arg Ala Ala Ala Ala
 100 105 110

Gln Phe Gln Val Pro Trp Leu Glu Ser Val Leu Ile Val Val Ser Asn
 115 120 125

Asn Ile Asp Glu Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ala Gln Glu Gly Ser Glu
 130 135 140

Val Asn Val Ile Gly Ile Gly Thr Ser Val Val Thr Cys Pro Gln Gln
 145 150 155 160

Pro Ser Leu Gly Gly Val Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Gly Gln Pro
 165 170 175

Arg Met Lys Leu Thr Glu Asp Pro Glu Lys Gln Thr Leu Pro Gly Ser
 180 185 190

Lys Ala Ala Phe Arg Leu Leu Gly Ser Asp Gly Ser Pro Leu Met Asp
 195 200 205

Met Leu Gln Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Gln Ala Gly Gln Glu Leu
 210 215 220

Arg Val Trp Pro Pro Gly Ala Gln Glu Pro Cys Thr Val Arg Pro Ala
 225 230 235 240

Gln Val Glu Pro Leu Leu Arg Leu Cys Leu Gln Gln Gly Gln Leu Cys
 245 250 255

Glu Pro Leu Pro Ser Leu Ala Glu Ser Arg Ala Leu Ala Gln Leu Ser
 260 265 270

Leu Ser Arg Leu Ser Pro Glu His Arg Arg Leu Arg Ser Pro Ala Gln
 275 280 285

Tyr Gln Val Val Leu Ser Glu Arg Leu Gln Ala Leu Val Asn Ser Leu
 290 295 300

Cys Ala Gly Gln Ser Pro
 305 310

10

20

30

<210> 15
 <211> 1073
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 <220>

<221> CDS
 <222> (71)..(688)
 <400> 15

```

ggcacgaggg gtgccccgc ctcacctgca gaggggccgt tccgggctcg aaccggcac      60
cttcgggaaa atg gcg gct gcc agg ccc agc ctg ggc cga gtc ctc cca      109
      Met Ala Ala Ala Arg Pro Ser Leu Gly Arg Val Leu Pro
      1          5          10

gga tcc tct gtc ctg ttc ctg tgt gac atg cag gag aag ttc cgc cac      157
Gly Ser Ser Val Leu Phe Leu Cys Asp Met Gln Glu Lys Phe Arg His
      15          20          25

aac atc gcc tac ttc cca cag atc gtc tca gtg gct gcc cgc atg ctc      205
Asn Ile Ala Tyr Phe Pro Gln Ile Val Ser Val Ala Ala Arg Met Leu
      30          35          40          45

aag gtg gcc cgg ctg ctt gag gtg cca gtc atg ctg acg gag cag tac      253
Lys Val Ala Arg Leu Leu Glu Val Pro Val Met Leu Thr Glu Gln Tyr
      50          55          60

cca caa ggc ctg ggc ccc acg gtg ccc gag ctg ggg act gag ggc ctt      301
Pro Gln Gly Leu Gly Pro Thr Val Pro Glu Leu Gly Thr Glu Gly Leu
      65          70          75

cgg ccg ctg gcc aag acc tgc ttc agc atg gtg cct gcc ctg cag cag      349
Arg Pro Leu Ala Lys Thr Cys Phe Ser Met Val Pro Ala Leu Gln Gln
      80          85          90

gag ctg gac agt cgg ccc cag ctg cgc tct gtg ctg ctc tgt ggc att      397
Glu Leu Asp Ser Arg Pro Gln Leu Arg Ser Val Leu Leu Cys Gly Ile
      95          100          105

gag gca cag gcc tgc atc ttg aac acg acc ctg gac ctc cta gac cgg      445
Glu Ala Gln Ala Cys Ile Leu Asn Thr Thr Leu Asp Leu Leu Asp Arg
      110          115          120          125

ggg ctg cag gtc cat gtg gtg gtg gac gcc tgc tcc tca cgc agc cag      493
Gly Leu Gln Val His Val Val Val Asp Ala Cys Ser Ser Arg Ser Gln
      130          135          140

gtg gac cgg ctg gtg gct ctg gcc cgc atg aga cag agt ggt gcc ttc      541
Val Asp Arg Leu Val Ala Leu Ala Arg Met Arg Gln Ser Gly Ala Phe
      145          150          155

ctc tcc acc agc gaa ggg ctc att ctg cag ctt gtg ggc gat gcc gtc      589
Leu Ser Thr Ser Glu Gly Leu Ile Leu Gln Leu Val Gly Asp Ala Val
      160          165          170

cac ccc cag ttc aag gag atc cag aaa ctc atc aag gag ccc gcc cca      637
His Pro Gln Phe Lys Glu Ile Gln Lys Leu Ile Lys Glu Pro Ala Pro
      175          180          185

gac agc gga ctg ctg ggc ctc ttc caa ggc cag aac tcc ctc ctc cac      685
Asp Ser Gly Leu Leu Gly Leu Phe Gln Gly Gln Asn Ser Leu Leu His

```

10

20

30

```

190          195          200          205
tga actccaaccc tgccttgagg gaagaccacc ctctgtcac ccggacctca      738
gtggaagccc gttcccccca tccctggatc ccaagagtgg tgcgatccac caggagtgcc      798
gcccccttgt gggggggggc aggggtgctgc cttcccattg gacagctgct cccggaaatg      858
caaatgagac tcctggaaac tgggtgggaa ttggctgagc caagatggag gcggggctcg      918
gccccggggc acttcacggg gcgggaaggg gaggggaaga agagtctcag actgtgggac      978
acggactcgc agaataaaca tatatgtggc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1038
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa                                1073

```

10

```

<210> 16
<211> 205
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 16

```

```

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ser Leu Gly Arg Val Leu Pro Gly Ser Ser
1          5          10          15

```

```

Val Leu Phe Leu Cys Asp Met Gln Glu Lys Phe Arg His Asn Ile Ala
          20          25          30

```

```

Tyr Phe Pro Gln Ile Val Ser Val Ala Ala Arg Met Leu Lys Val Ala
          35          40          45

```

```

Arg Leu Leu Glu Val Pro Val Met Leu Thr Glu Gln Tyr Pro Gln Gly
          50          55          60

```

```

Leu Gly Pro Thr Val Pro Glu Leu Gly Thr Glu Gly Leu Arg Pro Leu
65          70          75          80

```

```

Ala Lys Thr Cys Phe Ser Met Val Pro Ala Leu Gln Gln Glu Leu Asp
          85          90          95

```

```

Ser Arg Pro Gln Leu Arg Ser Val Leu Leu Cys Gly Ile Glu Ala Gln
          100          105          110

```

```

Ala Cys Ile Leu Asn Thr Thr Leu Asp Leu Leu Asp Arg Gly Leu Gln
          115          120          125

```

```

Val His Val Val Val Asp Ala Cys Ser Ser Arg Ser Gln Val Asp Arg

```

20

30

130

135

140

Leu Val Ala Leu Ala Arg Met Arg Gln Ser Gly Ala Phe Leu Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Glu Gly Leu Ile Leu Gln Leu Val Gly Asp Ala Val His Pro Gln
 165 170 175

Phe Lys Glu Ile Gln Lys Leu Ile Lys Glu Pro Ala Pro Asp Ser Gly
 180 185 190

Leu Leu Gly Leu Phe Gln Gly Gln Asn Ser Leu Leu His
 195 200 205

10

<210> 17
 <211> 1825
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (144)..(983)
 <400> 17

agagtgcgac cgagatgttc cactcgctgg cgtccggggcc gctggtgata tccggttagca 60

ctcggggccgg cggacagtga gggcgcgaca acaagggagg tgacacagtt ttccatttag 120

20

atcaacaact tcaagttcctt acc atg gaa aat tcc gag aag act gaa gtg gtt 173
 Met Glu Asn Ser Glu Lys Thr Glu Val Val
 1 5 10

ctc ctt gct tgt ggt tca ttc aat ccc atc acc aac atg cac ctc agg 221
 Leu Leu Ala Cys Gly Ser Phe Asn Pro Ile Thr Asn Met His Leu Arg
 15 20 25

ttg ttt gag ctg gcc aag gac tac atg aat gga aca gga agg tac aca 269
 Leu Phe Glu Leu Ala Lys Asp Tyr Met Asn Gly Thr Gly Arg Tyr Thr
 30 35 40

gtt gtc aaa ggc atc atc tct cct gtt ggt gat gcc tac aag aag aaa 317
 Val Val Lys Gly Ile Ile Ser Pro Val Gly Asp Ala Tyr Lys Lys Lys
 45 50 55

30

gga ctc att cct gcc tat cac cgg gtc atc atg gca gaa ctt gct acc 365
 Gly Leu Ile Pro Ala Tyr His Arg Val Ile Met Ala Glu Leu Ala Thr
 60 65 70

aag aat tct aaa tgg gtg gaa gtt gat aca tgg gaa agt ctt cag aag 413
 Lys Asn Ser Lys Trp Val Glu Val Asp Thr Trp Glu Ser Leu Gln Lys
 75 80 85 90

gag tgg aaa gag act ctg aag gtg cta aga cac cat caa gag aaa ttg 461
 Glu Trp Lys Glu Thr Leu Lys Val Leu Arg His His Gln Glu Lys Leu
 95 100 105

gag gct agt gac tgt gat cac cag cag aac tca cct act cta gaa agg 509
 Glu Ala Ser Asp Cys Asp His Gln Gln Asn Ser Pro Thr Leu Glu Arg
 110 115 120

cct gga agg aag agg aag tgg act gaa aca caa gat tct agt caa aag 557
 Pro Gly Arg Lys Arg Lys Trp Thr Glu Thr Gln Asp Ser Ser Gln Lys
 125 130 135

aaa tcc cta gag cca aaa aca aaa gct gtg cca aag gtc aag ctg ctg 605
 Lys Ser Leu Glu Pro Lys Thr Lys Ala Val Pro Lys Val Lys Leu Leu
 140 145 150

tgt ggg gca gat tta ttg gag tcc ttt gct gtt ccc aat ttg tgg aag 653
 Cys Gly Ala Asp Leu Leu Glu Ser Phe Ala Val Pro Asn Leu Trp Lys
 155 160 165 170

agt gaa gac atc acc caa atc gtg gcc aac tat ggg ctc ata tgt gtt 701
 Ser Glu Asp Ile Thr Gln Ile Val Ala Asn Tyr Gly Leu Ile Cys Val
 175 180 185

act cgg gct gga aat gat gct cag aag ttt atc tat gaa tcg gat gtg 749
 Thr Arg Ala Gly Asn Asp Ala Gln Lys Phe Ile Tyr Glu Ser Asp Val
 190 195 200

ctg tgg aaa cac cgg agc aac att cac gtg gtg aat gaa tgg atc gct 797
 Leu Trp Lys His Arg Ser Asn Ile His Val Val Asn Glu Trp Ile Ala
 205 210 215

aat gac atc tca tcc aca aaa atc cgg aga gcc ctc aga agg ggc cag 845
 Asn Asp Ile Ser Ser Thr Lys Ile Arg Arg Ala Leu Arg Arg Gly Gln
 220 225 230

agc att cgc tac ttg gta cca gat ctt gtc caa gaa tac att gaa aag 893
 Ser Ile Arg Tyr Leu Val Pro Asp Leu Val Gln Glu Tyr Ile Glu Lys
 235 240 245 250

cat aat ttg tac agc tct gag agt gaa gac agg aat gct ggg gtc atc 941
 His Asn Leu Tyr Ser Ser Glu Ser Glu Asp Arg Asn Ala Gly Val Ile
 255 260 265

ctg gcc cct ttg cag aga aac act gca gaa gct aag aca tag 983
 Leu Ala Pro Leu Gln Arg Asn Thr Ala Glu Ala Lys Thr
 270 275

gaattctaca gcatgatatt tcagacttcc catttgggga tctgaaacaa tctgggagtt 1043

aataactggg gaaagaagtt gtgatctgtt gcctaaacta aagcttaaaa gtttagtaaa 1103

aatcgtctgg gcacagtggc tcacgcctgt agtcccagct acttgggagg ctgaggcagg 1163

agaatcactt gacccaggt ggtggagggt gcagtggagg aagattgcac cattgcactc 1223

cagcctggcg acagagcaag actctgtctc aaaaaaaaaa aaaaaattta gtaaaaatca 1283

10

20

30

atggtaagct aaaataagtt tttgtttgtt tttttgtttt tgagatggag tctctactaa 1343
aaatacaaaa aattagccag gcatgggtgcc gcataactat aatcccagct acttgggagg 1403
ctgaggcagg agaatcgctt gaaccgggga ggcacaggtt ccagtgggcc aaggttgtgc 1463
cactgcactc cagcctgggc aaaaaagcaa aactccatct caaagagaaa aaaaaaaaaag 1523
accgggtgtg gtgggtcaca cctgtaatcc cagcactttg ggaggcctaa gtgggtggat 1583
cacgtgaggt caagagttca agaccagcct ggccaatatg gtgaaacccc atctctacta 1643
agaatacaaaa aaattagctg agcatgggtg tgggttcctg tagtcccagc tacttgggag 1703
gctgaggcag gagaatcgct tgaacctggg aggcagaggt tgcagtaagc caagatcgctg 1763
ccattgcact ccagcctggg tgacagagcg agactccatc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1823
aa 1825

<210> 18
<211> 279
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 18

Met Glu Asn Ser Glu Lys Thr Glu Val Val Leu Leu Ala Cys Gly Ser
1 5 10 15

Phe Asn Pro Ile Thr Asn Met His Leu Arg Leu Phe Glu Leu Ala Lys
20 25 30

Asp Tyr Met Asn Gly Thr Gly Arg Tyr Thr Val Val Lys Gly Ile Ile
35 40 45

Ser Pro Val Gly Asp Ala Tyr Lys Lys Lys Gly Leu Ile Pro Ala Tyr
50 55 60

His Arg Val Ile Met Ala Glu Leu Ala Thr Lys Asn Ser Lys Trp Val
65 70 75 80

Glu Val Asp Thr Trp Glu Ser Leu Gln Lys Glu Trp Lys Glu Thr Leu
85 90 95

Lys Val Leu Arg His His Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ser Asp Cys Asp
100 105 110

10

20

30

His Gln Gln Asn Ser Pro Thr Leu Glu Arg Pro Gly Arg Lys Arg Lys
 115 120 125
 Trp Thr Glu Thr Gln Asp Ser Ser Gln Lys Lys Ser Leu Glu Pro Lys
 130 135 140
 Thr Lys Ala Val Pro Lys Val Lys Leu Leu Cys Gly Ala Asp Leu Leu
 145 150 155 160
 Glu Ser Phe Ala Val Pro Asn Leu Trp Lys Ser Glu Asp Ile Thr Gln
 165 170 175
 Ile Val Ala Asn Tyr Gly Leu Ile Cys Val Thr Arg Ala Gly Asn Asp
 180 185 190
 Ala Gln Lys Phe Ile Tyr Glu Ser Asp Val Leu Trp Lys His Arg Ser
 195 200 205
 Asn Ile His Val Val Asn Glu Trp Ile Ala Asn Asp Ile Ser Ser Thr
 210 215 220
 Lys Ile Arg Arg Ala Leu Arg Arg Gly Gln Ser Ile Arg Tyr Leu Val
 225 230 235 240
 Pro Asp Leu Val Gln Glu Tyr Ile Glu Lys His Asn Leu Tyr Ser Ser
 245 250 255
 Glu Ser Glu Asp Arg Asn Ala Gly Val Ile Leu Ala Pro Leu Gln Arg
 260 265 270
 Asn Thr Ala Glu Ala Lys Thr
 275

10

20

30

<210> 19
 <211> 5690
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (338)..(1261)
 <400> 19

atataaactc taaggaagac agtgcaggag tgaagtgggc tgggggcgat agagaggatg 60
 ggggtggggca ccaggcgaga gatgcgaagg aagccagaac gaaaagagag cgaccgagga 120

30

185	190	195	
tgt ggt agt gac ctg ctg gag tcc ttc tgc atc cca ggg ctc tgg aac			979
Cys Gly Ser Asp Leu Leu Glu Ser Phe Cys Ile Pro Gly Leu Trp Asn			
200	205	210	
gag gca gat atg gag gtg att gtt ggt gac ttt ggg att gtg gtg gtg			1027
Glu Ala Asp Met Glu Val Ile Val Gly Asp Phe Gly Ile Val Val Val			
215	220	225	230
ccc cgg gat gca gcc gac aca gac cga atc atg aat cac tcc tca ata			1075
Pro Arg Asp Ala Ala Asp Thr Asp Arg Ile Met Asn His Ser Ser Ile			
	235	240	245
ctc cgc aaa tac aaa aac aac atc atg gtg gtg aag gat gac atc aac			1123
Leu Arg Lys Tyr Lys Asn Asn Ile Met Val Val Lys Asp Asp Ile Asn			
	250	255	260
cat ccc atg tct gtt gtc agc tca acc aag agc agg ctg gcc ctg cag			1171
His Pro Met Ser Val Val Ser Ser Thr Lys Ser Arg Leu Ala Leu Gln			
	265	270	275
cat ggg gac ggc cat gtt gtg gat tac ctg tcc cag ccg gtc atc gac			1219
His Gly Asp Gly His Val Val Asp Tyr Leu Ser Gln Pro Val Ile Asp			
	280	285	290
tac atc ctc aaa agc cag ctg tac atc aat gcc tcc ggc tag			1261
Tyr Ile Leu Lys Ser Gln Leu Tyr Ile Asn Ala Ser Gly			
295	300	305	
cagccctctg tccctcggca acacaatggc cccctccatct ttgtcagccc cctgtttctc			1321
tccctgctct ctgtttctcc atctcctcgt cttgactgtt tccctactt gctgacttaa			1381
cccccatag tgtgggggac ctgcagagaa ccatggcatt cccatttcca cagtcattct			1441
tggacagact tccctctagt ctccgggttg ggggtgggtg agggaatggg gtgggagtcg			1501
ggggaagtgc agtccttgga gatgtactgg tgtccgtctc ccagcatgct ctagagaggc			1561
ggctctggtg cccatcctcc cagcacgctc tggggaggcg gctctggtgc ccatcctccc			1621
agcatgctct agagaggcgg ctctggtgcc cctcctccca gcatgctctg gggaggcggc			1681
tctggctctt gccttcccag catgcccttt actacaaagg gctatttttc tttctttct			1741
tttgtttatt tatttttctt tgttactctc ctgtagaact tggatgaaat cagtgtccat			1801
ggttctttat gtttgtagtc ttgatgtgct cctgtggtat tacttccct ctgataggac			1861
attgtagcca gcctcagcac tcagttagtt catcagggcc acaccagta gagaaggcca			1921
agcaacctcc acttcttcag caccacacac acgcacacac acacacacgc acacatgcgt			1981
gtgcaccgcg gcacgcacat acacacacac atatagcagt agcagcagca gcagcagcag			2041
cagcaacctt tgatcaggag tgagattttc gggttctgaa acctgggaca cgagtctgtg			2101

10

20

30

aatagtcgggt tttctcagaa taatttgaat ctgttttctt agtttcaaatt gaccatttcc 2161
ctgatgctct gagcttatga tcacacagag ccagtccttc ctcatttccct ggtggcatct 2221
gttcattttac ctttgtggac tgtagctgat ggcacagtgc gggttcccta ccagccaggg 2281
gtttccaagg gacctttgga ggccatgctt agacacattc ctgtacctga gaacaaccac 2341
ataggcagga ccagatccac atcgtgcagt cgtgtcataa aaaaacaaaa caaaacaaaa 2401
aaacactagg agtccactca accctggagg tctttgctaa ttggaattat gtattgtctg 2461
ttgggctggg aaatgtctct ttcatttctt aagtcagga tgaactagga gaaagcaatt 2521
tgttgccctg atgataactg atgattttca ccctctctag ctgaggtaac tcagacagtg 2581
catgagggtca gtttcttctt gagaagcagt gccttggctt tgtttctgtg gttggttcta 2641
gccctgcag agcctgggag ctgcaggaac tgtctgagaa aatctcccta ataggggagt 2701
gggttcccag aaggagatc tgggaggggt caggagccac taagttgctt cactcctttt 2761
ttctctaatt ttctaccttc ctctctgttc ctgcagacag ttttgccagc tttgcttctg 2821
gttactaggg tctcatcgct gtccctgctt gagagccata aggaaattgc tgtctgtgct 2881
tttgtgtctc tcattccagtc tctggctctt gggattcttg tctttgagaa atagtccctg 2941
agtattagga tactttttatc aaaatctagt accagctacg gccagaaagg gccagggtggg 3001
acctgaaagc aaagacaatg ttctttacca cacgtttcac atctgcaaca tccttcaatt 3061
gcgggaaaaag gaacttgatt taacagaaga acatggtaga gcagcatcca gaaagtctgt 3121
tattcctctt ggattttttg aaataatctt cagaggaagg aaggaaaaac ctattttggg 3181
gtatcagtgt ttgactaggg atcatgaaat aataaactga aaaaaacttt agagttcagt 3241
tgatccaaca ctttccttta aaagttgagg gagcagaggc ccatgggatt aaatggctgg 3301
tccaggtcag ccagcaggtg tagggcctga caagaacata ttgtttccct gacccttagg 3361
ccgtcacacc acaccctcca ttctctcatg ttgctgacca ggtgcccata tgattttctac 3421
acttcccaag ccttaccctg gcatctttct tttaaattat atctgtccca ggtgctctcc 3481
acacatagga tggtaatgcc agtcccaggg gaggggtgtg tagtaaggaa ggccactgtt 3541
aggtttcctt tagaaataaa gagatctcag cagcttgga gaaatcccag aagcggaact 3601
ccatcaatcc aagaaagagt tgctttgtgg aagggtgaagg aagaccaca gagtgtctcag 3661
gatgatgcta ttgctggaga gcgaaagatg gaacagcctt gtccaggcag aacagtcata 3721
agccaggaaa tgaaacaaa gaaaacaggt gcctgaattt cctggggaaa catggcttgt 3781

10

20

30

ttaaggactt ggagttatgg atggaattta tgggacccac gtgagcagac ctgaggaagg 3841
 ctcgatttct tttgtttctt ggtccactct gtcactctgc tctggtcaag ccccatTTtg 3901
 tctacagccc atgagaagga atgaggettg ttctgcactc tcagcatgca gtccgaaagc 3961
 atgtgggagt ggggagggaa agtgagatga attaagacaa agaacagggtg ccatagaagt 4021
 agatttctag gaatgaagtg gggcagatct tatctttgtg gattacaggc actgtactaa 4081
 aaacagggtt cctattttaat ataaaaagaa agtgaatctt cttttggata gaatcatcca 4141
 ttcccatcgc cgcacccccct accccccaaa cacacacaca cacacacaca cacacacaca 4201
 cacacacaca cacacacaca cgcctactc ttcatTTgct aggggaagggt cacagcacia 4261
 ctaaattccag gacaggacat tgtgaccatg acccagccac agtcaatacc agaaagatga 4321
 ttccagagtct gaagtggTgc cccaggTgcc aacaggataa cctctacccc ccgactttgt 4381
 ctctggggTc ctgttccTtc ctgcaaagcc caatccaaga ctggcatggc tcagaggTtg 4441
 tgagaaaggc atggactgga acaatcatgt ccagaggggt ctggagcttt gtttccTgtt 4501
 caccagcaaa aaatgtctct cccatttttc tgaaagtggc tgatgtaaga acaggcagaa 4561
 ggaaaaacct ttttgtcaat aactctgtcc ttaaggaatg gtctctggg agggctgtgc 4621
 tgctagtggg tacctcagtc acacaccccc aaccccaggc agcctctaga gccttctTgc 4681
 tttcatTTtc cttgaatgta cataggaaca agggggaaag tctcttactg aagtgcctga 4741
 aacccaaagc tagagcttct agagacgccg ttcttccTgt ctccagcttg ccagccTTtc 4801
 aacaatgttc tctagtTtca agctccagct tctcagaaag aattaaagaa cttgtctgtc 4861
 aaattaagta gaaagtgaga ctcaataata actgaactac agcaaaaggc agagaattac 4921
 agggagaaaa aacttgtact taccagccca attctactct cctcaaactg acacacacac 4981
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacactc ttttagggga ctaagagaga 5041
 gaagcatgtt attacatttt actcatccaa acagtaatgc aaaaataaaa cggtagaata 5101
 tgaaaagctc aggatctctc ccaaggctac ctactgcagg agggccaaca ggtgagatgg 5161
 gaagaatgga aacagggacc gattttgtag ctcatacaat taggacacct taggaatagc 5221
 attgtagtaa tggtagtgaa tatgtctctgc caaattcatc cagtctgcac catcttatag 5281
 ctgcccagca cactcgactg ttcatgtggt ctctttgtag tgtgagtttTg gagtgtccta 5341
 ttagcctgtt ctggttagga atgagttaac ggctctttcc ctcaacctta gtctagtccc 5401
 agggctgagg attcagctgg atccacatgg tcttgagggt tggcatgagg agggggaagc 5461
 ttttttgaat cgctttttga tcacataatc tgccatttta agagtaagat ttgctttatg 5521

10

20

30

gaaatcaatt cattaataaaa aaatgatatt caagttgcaa taccatttca cagtgaata 5581
 ttttgagtac aattttggtg ctagaatagt catgggcaag agttttatgc aaaatgttcc 5641
 aattatgtta ataaataaga caatgcwaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5690

<210> 20
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 20

Met Thr Glu Thr Thr Lys Thr His Val Ile Leu Leu Ala Cys Gly Ser
 1 5 10 15

10

Phe Asn Pro Ile Thr Lys Gly His Ile Gln Met Phe Glu Arg Ala Arg
 20 25 30

Asp Tyr Leu His Lys Thr Gly Arg Phe Ile Val Ile Gly Gly Ile Val
 35 40 45

Ser Pro Val His Asp Ser Tyr Gly Lys Gln Gly Leu Val Ser Ser Arg
 50 55 60

His Arg Leu Ile Met Cys Gln Leu Ala Val Gln Asn Ser Asp Trp Ile
 65 70 75 80

20

Arg Val Asp Pro Trp Glu Cys Tyr Gln Asp Thr Trp Gln Thr Thr Cys
 85 90 95

Ser Val Leu Glu His His Arg Asp Leu Met Lys Arg Val Thr Gly Cys
 100 105 110

Ile Leu Ser Asn Val Asn Thr Pro Ser Met Thr Pro Val Ile Gly Gln
 115 120 125

Pro Gln Asn Glu Thr Pro Gln Pro Ile Tyr Gln Asn Ser Asn Val Ala
 130 135 140

30

Thr Lys Pro Thr Ala Ala Lys Ile Leu Gly Lys Val Gly Glu Ser Leu
 145 150 155 160

Ser Arg Ile Cys Cys Val Arg Pro Pro Val Glu Arg Phe Thr Phe Val
 165 170 175

Asp Glu Asn Ala Asn Leu Gly Thr Val Met Arg Tyr Glu Glu Ile Glu
 180 185 190
 Leu Arg Ile Leu Leu Leu Cys Gly Ser Asp Leu Leu Glu Ser Phe Cys
 195 200 205
 Ile Pro Gly Leu Trp Asn Glu Ala Asp Met Glu Val Ile Val Gly Asp
 210 215 220
 Phe Gly Ile Val Val Val Pro Arg Asp Ala Ala Asp Thr Asp Arg Ile
 225 230 235 240
 Met Asn His Ser Ser Ile Leu Arg Lys Tyr Lys Asn Asn Ile Met Val
 245 250 255
 Val Lys Asp Asp Ile Asn His Pro Met Ser Val Val Ser Ser Thr Lys
 260 265 270
 Ser Arg Leu Ala Leu Gln His Gly Asp Gly His Val Val Asp Tyr Leu
 275 280 285
 Ser Gln Pro Val Ile Asp Tyr Ile Leu Lys Ser Gln Leu Tyr Ile Asn
 290 295 300
 Ala Ser Gly
 305

10

20

【図 1】

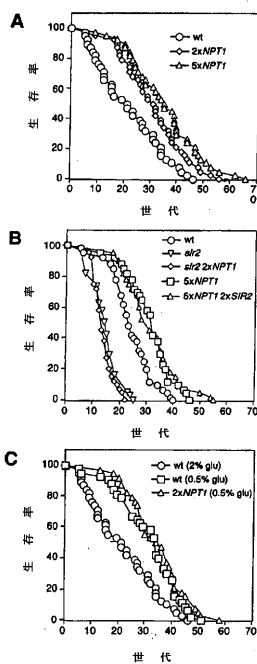
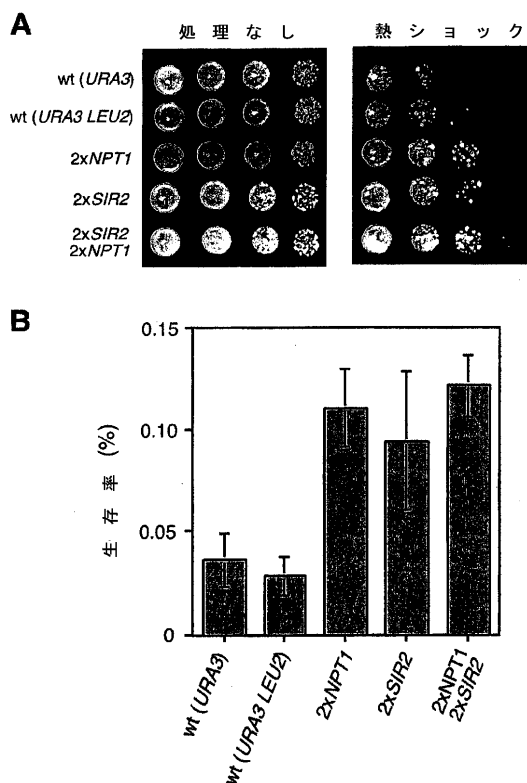
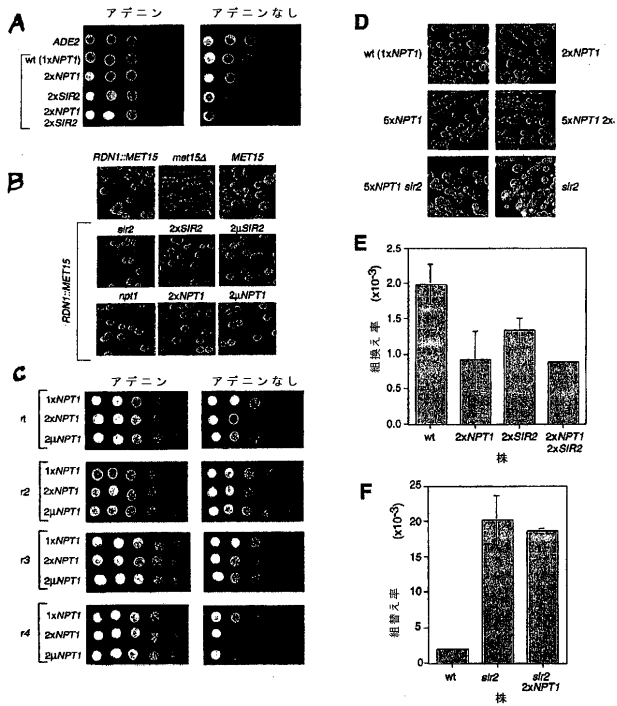


Figure 1

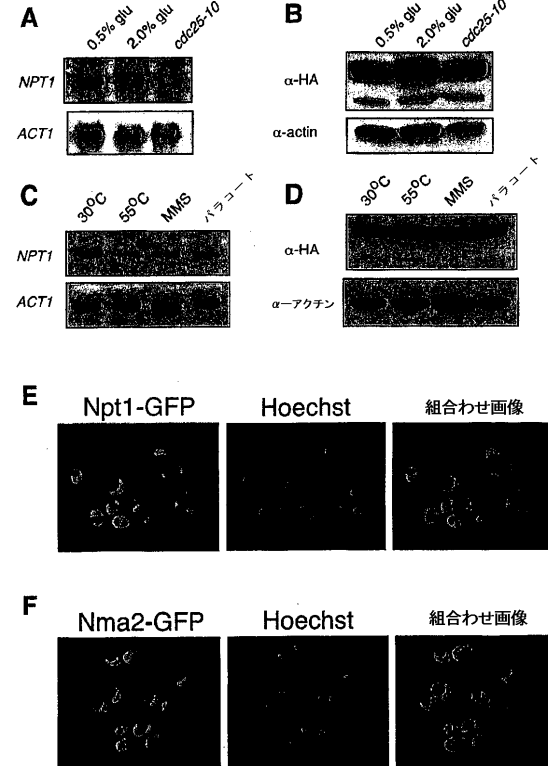
【図 2】



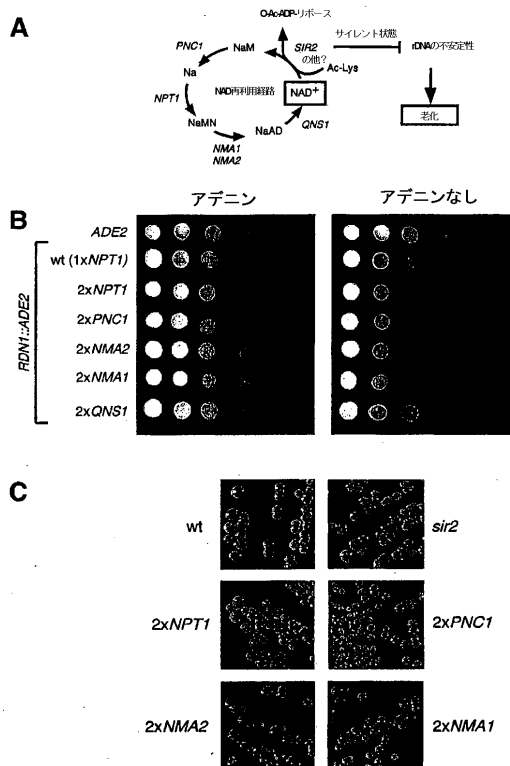
【図 3】



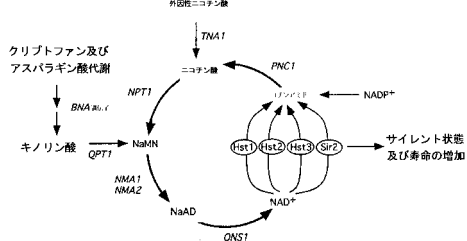
【図 4】



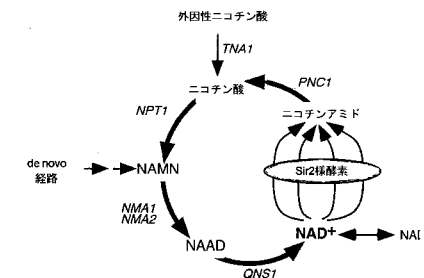
【図 5】



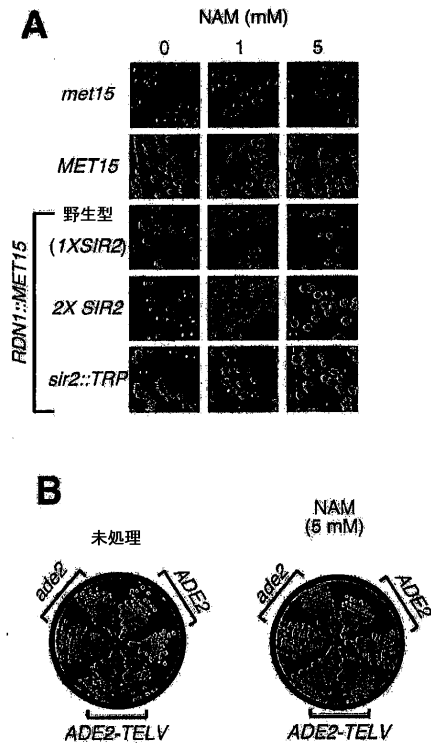
【図 6】



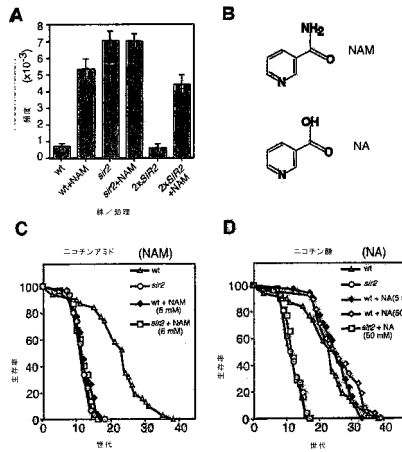
【図 7】



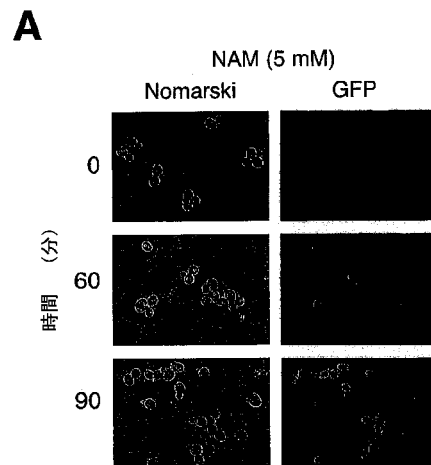
【 図 8 】



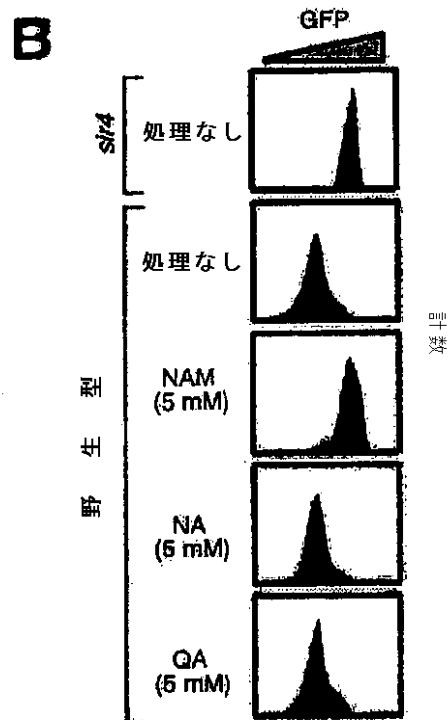
【 図 9 】



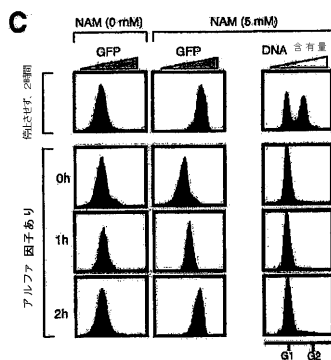
【 図 10 A 】



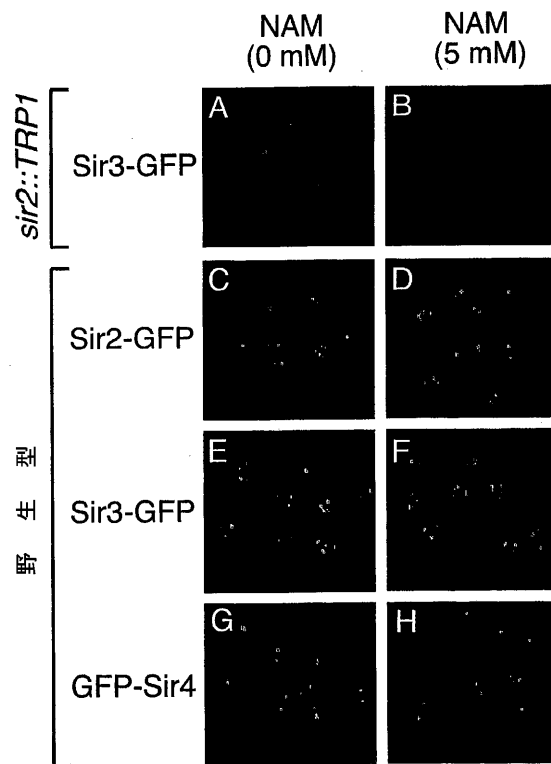
【 図 10 B 】



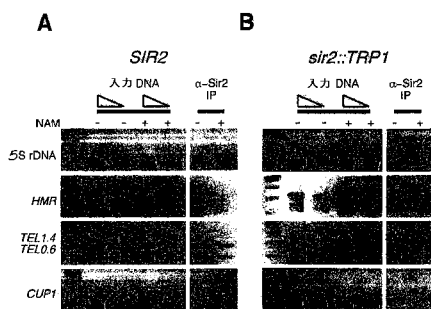
【図 10C】



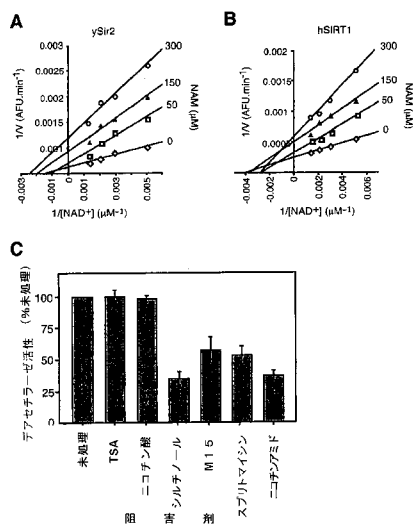
【図 11】



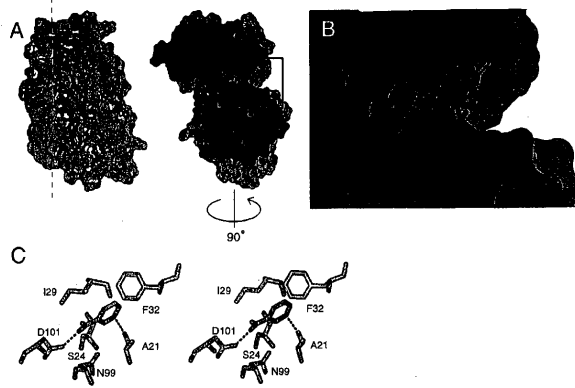
【図 12】



【図 13】



【図 14】



【図 15】

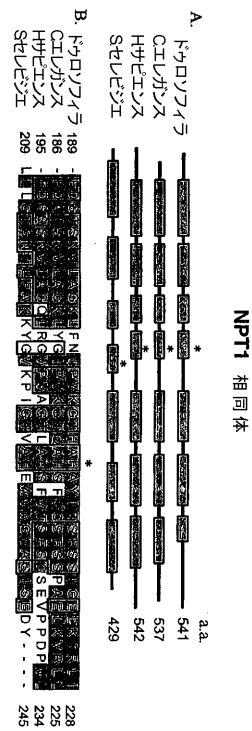
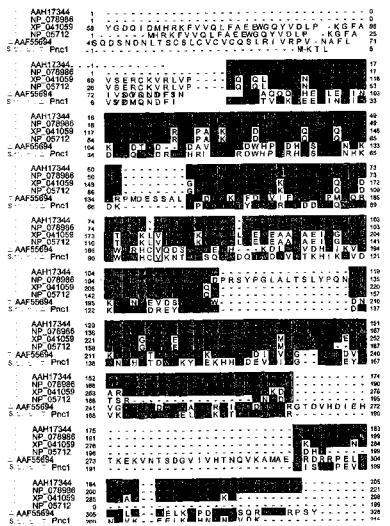


Figure 15

【図 16】



【図 17】

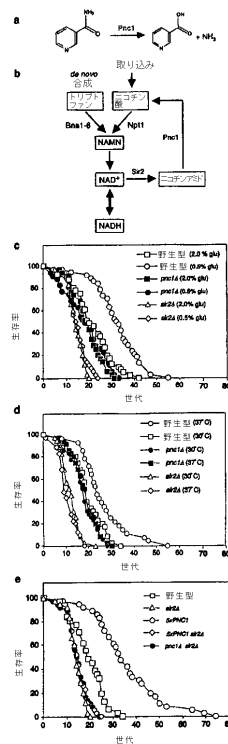
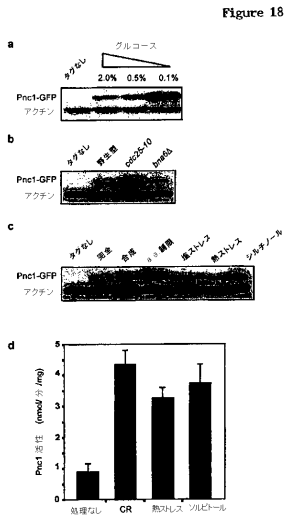
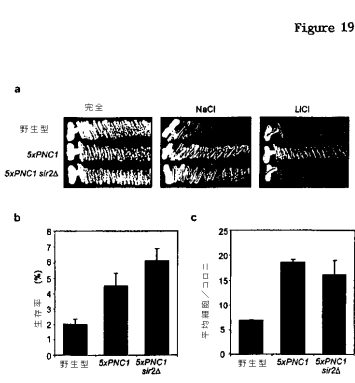


Figure 17

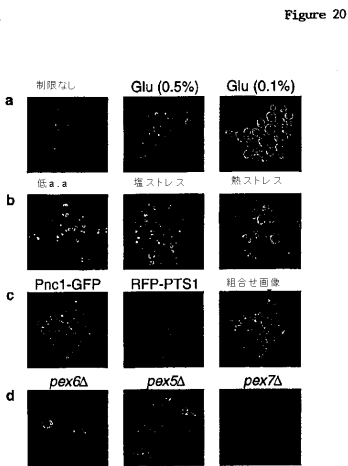
【 図 1 8 】



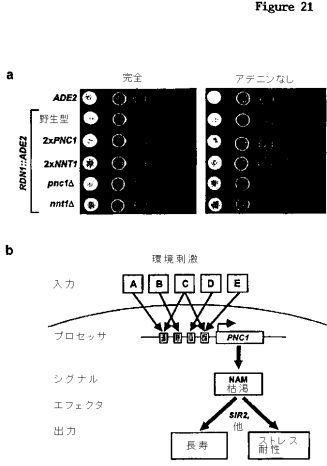
【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/25016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12N 9/12; 1/20; C12Q 1/00, 1/58; C07H 21/04; A01N 25/00		
US CL : 435/ 194, 15, 4, 252.3; 536/23.2; 514/789		
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) U.S. : 435/ 194, 15, 4, 252.3; 536/23.2; 514/789		
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 practicable, search terms used) MEDLINE, EAST/WEST: NAD, NAD+, NPT1, PNC1, NMA1 NAM2, salvage, mod?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anderson et al. Manipulation of a nuclear NAD+ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD+ levels. J Biol Chem. March 2002, Vol 277. No. 21, pages 18881-90..	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 09 January 2005 (09.01.2005)		Date of mailing of the international search report 03 FEB 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Ponnathapu Achutamurthy Telephone No. 571-272-1450

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/16	C 1 2 N 1/16	A
C 1 2 N 5/06	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/34	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/34	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/48	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 5/00	E
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,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 ポストン ウェストランド アベニュー 9
1

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB20 CB01 FA16 FB03
4B024 AA01 AA11 AA20 BA10 BA11 CA02 DA02 DA12 EA04 GA11
HA11 HA17 HA20
4B063 QA05 QQ07 QQ08 QQ21 QQ26 QQ30 QQ41 QQ61 QQ89 QQ91
QR76 QR77 QR80 QS31
4B065 AA72X AA72Y AA90X AA90Y AC14 AC20 BA02 BA30 CA29 CA31
CA43 CA44 CA46
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB212