

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4651893号  
(P4651893)

(45) 発行日 平成23年3月16日(2011.3.16)

(24) 登録日 平成22年12月24日(2010.12.24)

|                |               |                  |                |                             |
|----------------|---------------|------------------|----------------|-----------------------------|
| (51) Int.Cl.   |               | F I              |                |                             |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>15/09</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>C 1 2 N</b> | <b>15/00</b> <b>Z N A A</b> |
| <b>A O 1 K</b> | <b>67/027</b> | <b>(2006.01)</b> | <b>A O 1 K</b> | <b>67/027</b>               |
| <b>C O 7 K</b> | <b>14/47</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>C O 7 K</b> | <b>14/47</b>                |
| <b>C O 7 K</b> | <b>16/18</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>C O 7 K</b> | <b>16/18</b>                |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>1/21</b>   | <b>(2006.01)</b> | <b>C 1 2 N</b> | <b>1/21</b>                 |

請求項の数 17 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-539872 (P2001-539872)  
 (86) (22) 出願日 平成12年11月17日(2000.11.17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2000/008121  
 (87) 国際公開番号 W02001/038529  
 (87) 国際公開日 平成13年5月31日(2001.5.31)  
 審査請求日 平成19年3月23日(2007.3.23)  
 (31) 優先権主張番号 特願平11-329649  
 (32) 優先日 平成11年11月19日(1999.11.19)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 FERM BP-6934  
 微生物の受託番号 FERM BP-6935  
 微生物の受託番号 FERM BP-6936

(73) 特許権者 503310763  
 社団法人芝蘭会  
 京都府京都市左京区吉田牛の宮町11-1  
 (74) 代理人 100105647  
 弁理士 小栗 昌平  
 (74) 代理人 100105474  
 弁理士 本多 弘徳  
 (74) 代理人 100108589  
 弁理士 市川 利光  
 (74) 代理人 100132986  
 弁理士 矢澤 清純  
 (74) 代理人 100129160  
 弁理士 古館 久丹子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ポリペプチド、新規DNA、新規抗体および新規遺伝子改変動物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号 1 または 2 記載のアミノ酸配列からなる老化を抑制する活性を有するポリペプチド。

【請求項2】

請求項1記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項3】

配列番号 4 または 5 に記載の塩基配列からなるDNA。

【請求項4】

請求項3に記載のDNAから選ばれるDNAと95%以上の相同性を有するDNAであり、かつ老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするDNA。 10

【請求項5】

請求項2～4のいずれか1項に記載のDNAから選ばれるDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【請求項6】

請求項1記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項7】

請求項6記載の抗体を用いる、請求項1記載のポリペプチドの免疫学的定量法。

【請求項8】

請求項5記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。 20

## 【請求項 9】

請求項 5 記載の組換え体 DNA を保有する形質転換体を培養液中で培養し、該組換え体 DNA がコードするポリペプチドを該培養液中に生成蓄積させ、該培養液より該ポリペプチドを採取することを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチドの製造法。

## 【請求項 10】

請求項 1 記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、被験試料より請求項 1 記載のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、請求項 1 記載のポリペプチドに対するリガンドの探索法。

## 【請求項 11】

請求項 1 記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、被験試料より請求項 1 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増強させる化合物を選択することを特徴とする、請求項 1 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増強させる化合物の探索法。

10

## 【請求項 12】

発現の増強を、請求項 7 記載の定量法を用いて検出することを特徴とする、請求項 11 記載の探索法。

## 【請求項 13】

発現の増強を、請求項 1 記載のポリペプチドをコードする mRNA 量を測定することにより検出することを特徴とする、請求項 11 記載の探索法。

## 【請求項 14】

請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を含む遺伝子の全部または一部を欠損または置換することにより、老化を抑制する活性を有するポリペプチドの発現の量、時期または組織特異性が変化した遺伝子欠失または置換非ヒト動物。

20

## 【請求項 15】

発現量の変化が、発現が低下または発現しない変化である請求項 14 記載の遺伝子欠失または置換非ヒト動物。

## 【請求項 16】

非ヒト動物が非ヒトほ乳類動物であることを特徴とする請求項 14 または 15 記載の動物。

## 【請求項 17】

非ヒト動物ほ乳類動物がマウスであることを特徴とする請求項 16 記載の動物。

30

## 【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、動物の老化を抑制する活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含む組換え体 DNA、該組換え体 DNA を保有する形質転換体、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドに対するリガンド、該ポリペプチドとリガンドとの特異的な結合を阻害する化合物、該ポリペプチドをコードする老化抑制遺伝子の発現を増加させる化合物、該化合物の探索法および該老化抑制遺伝子を欠損あるいは一部改変された動物の作製法と利用法に関する。

背景技術

40

老化現象は、通常加齢に伴い進行する個体の機能的、外見的变化における個体の劣化を意味し、老化に伴い種々の成人病の発症頻度が増加することが知られている。従って老化を何等かの形で制御できる薬剤は成人病の治療薬、予防薬、また、機能的、外見的劣化に対する保護薬、予防薬となることが期待される。

個体の老化に関する遺伝子レベルの研究は世界的に見てもまだ開始されたばかりであり、個体の老化に関する分子遺伝学的情報はこれまで皆無であった。しかし、遺伝的早期老化症は数種類知られており、代表的なものにウェルナー症候群、ハッチンソン・ギルフォード症候群（プロゲリア）、ダウン症候群、ターナー症候群、ルイ・バール症候群、ロスモンド・トムソン症候群等々がある（藤本 大三郎編：老化のメカニズムと制御、アイピーシー 1993年）。

50

ウェルナー症候群に関しては原因遺伝子の同定がなされている〔*Science*, 272, 258 (1996)〕。ウェルナー症候群の原因遺伝子はヘリカーゼと考えられており、ウェルナー症候群の患者の遺伝子には種々の変異が認められている。該患者においては、該遺伝子変異により正常なヘリカーゼ蛋白質が産生されず、その機能が発現されないことにより早期老化症状を示すものと考えられている。

以上のことから老化に関与する遺伝子が存在し、該遺伝子の変異を受けることにより、老化が促進されるとの考えが示された。他の遺伝的早期老化症にも原因遺伝子が存在するため、老化には複数の遺伝子が関与していると考えられている。

このような考えのもとに、本発明者らは老化に関与する遺伝子の探索を行い、老化の抑制活性を有するポリペプチドをコードする *klotho* 遺伝子のクローニングに成功している〔*Nature*, 390, 45 (1997)、WO 98/29544〕。*klotho* 遺伝子の変異により発現が低下したマウスでは以下の観察例に示すような種々の早期老化症状を示す。

〔観察例1〕外見的観察：老化マウスのホモ体（8から9週齢）は、体長約4cmで、同週齢の野生型マウス（約6cm）と比較してかなり小さい。また、胴の長さに対し、頭部の比率が大きい。老化マウス（8週齢、雄）では体躯が矮小であるものの、体毛のつや、四肢の爪等に異常は認められない。行動も正常である。

寿命については、1) 生後3週間前後から成長が停止し、徐々に活動性が低下する。

2) 寿命の短縮：平均寿命はオスが  $8.0 \pm 0.9$  週 ( $n = 13$ )、メスが  $9.3 \pm 0.9$  週 ( $n = 13$ ) であり、生後15週までに全例が死亡するという早期老化症状を特徴とする。

以下、8週令前後のホモのオス、メスそれぞれ5匹ずつ、およびそれらの同腹兄弟の野生型マウスのオス、メスそれぞれ4匹ずつを解剖して肉眼的観察の後、常法に従い（渡辺慶一、中根一穂編、酵素抗体法、学際企画、1992年 改訂3版）ホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切し、HE染色を施して病理観察を行った（以下、観察例12まで同一の手法で観察を行った）。

〔観察例2〕下垂体の病理観察：好酸性細胞の減少が認められた。下垂体の好酸性細胞は成長ホルモン（*growth hormone*：GH）またはプロラクチン（*prolactin*：PRL）を産生する細胞であるが、それらの数が減少している。高齢者ではGH分泌の低下が知られている。

〔観察例3〕性腺の病理観察：性腺が著明に萎縮しており、不妊であることを見出した。オスでは、精巣が肉眼的に著明に萎縮している。精細管の径は野生型の約1/3程度にまで萎縮し、精子成熟がパキテン期精母細胞までしか進んでおらず、精子が全く認められない。メスでは、卵巣・子宮がやはり肉眼的にも著明に萎縮している。卵子成熟が一次卵胞までしか進んでおらず、二次卵胞や黄体は認められない。

〔観察例4〕顎下腺の病理観察：正常なオスでは線状部に大量の好酸性顆粒を有しているが、ホモ体では線状部の細胞は丈が低く、好酸性顆粒もほとんど認められない。

〔観察例5〕腎臓の病理観察：小動脈壁を始め尿細管上皮、ボウマン嚢壁などに石灰沈着が認められる。ボウマン嚢壁は扁平上皮である。

〔観察例6〕血管系の病理観察：まずホモ個体では動脈硬化が顕著であった。胸部大動脈の径が不整で高度の中膜石灰化が存在し、内膜肥厚も認められた。このような中膜石灰化と内膜肥厚を主体とする動脈硬化は腎動脈などの中血管や実質臓器内の小血管に至るまで認められた。特に腎実質内の血管中膜石灰化は顕著であったが、糸球体・尿細管はほぼ正常であった。沈着物が確かに  $Ca^{2+}$  であることはKossa染色で確認した。大動脈中膜石灰化は高齢者によく認められる所見である。

〔観察例7〕肺組織の病理観察：肺胞壁の破壊をともなう肺胞構造の破壊が顕著であった。肺胞壁に石灰沈着が認められる。

〔観察例8〕軟部組織・軟骨の観察：気管粘膜固有層、胃粘膜固有層・粘膜筋板、肺胞上皮に石灰沈着が認められた。胃底腺細胞および粘膜下結合組織、筋層に石灰沈着が認められた。胃粘膜の石灰化は長期飼育のラット・マウスで認められる所見と類似している。ま

10

20

30

40

50

た、心臓の僧帽弁輪石灰化を認める個体もあった。僧帽弁輪石灰化は高齢者に特徴的な所見である。また、関節軟骨、気管軟骨、肋軟骨にも石灰沈着が認められた。これら硝子軟骨の石灰化は高齢者によく認められる所見である。

[観察例9] 骨組織病理観察およびX線観察：大腿骨遠位端の骨幹端の骨密度の上昇、骨端軟骨の肥厚が認められる。関節軟骨では軟骨細胞への不正な石灰沈着像が認められる。大腿骨、脛骨のX線所見ではX線透過度が亢進しており、骨塩密度の低下がうかがわれる。実際骨塩密度を測定すると骨幹部・脛骨遠位端・大腿骨近位端では野生型に比べ最高約半分にまで低下している。組織学的にも皮質骨が著しく低下している。ただし、脛骨近位端と大腿骨遠位端の骨幹端では例外的に一次海綿骨が増生しており、この部分でのみ骨塩密度が逆に上昇している。

10

[観察例10] 小脳の病理観察：小脳神経細胞層のプルキンエ細胞数の減少および孤在性壊死・軸索の膨化が認められた。小脳においては老化に伴いプルキンエ細胞が減少し、それに伴い軸索突起は膨化することが知られている。

[観察例11] 肝臓の病理観察：好酸性に染色されるグリコーゲン顆粒がほとんど認められない。肝細胞の細胞質は正常と比較するとやや小さい。

[観察例12] 胸腺の病理観察：胸腺が著明に萎縮しており、肉眼的には確認できない個体もあった。

上記の早期老化様症状を示すマウスにおいてklotho遺伝子を発現させることにより、早期老化症状が抑制されることから、該遺伝子が早期老化マウスでの早期老化症状の抑制遺伝子であることが明らかにされた。またklotho遺伝子を発現するアデノウィルス

20

を該早期老化症状を示すマウスに接種すると、明らかに体重増加、延命効果が認められ、早期老化症状の解消が認められた〔Nature, 390, 45 (1997)、WO 98/29544〕。

また、klotho遺伝子と相同性の高い、ヒト由来の老化抑制遺伝子もクローニングされている〔Nature, 390, 45 (1997)、WO 98/29544〕。以上のことから、老化抑制作用を有するポリペプチドの存在とその有用性が明らかとなったが、上述したように遺伝的早期老化症は複数あることから、その原因遺伝子も複数あり、老化症状には複数の遺伝子が関与していると考えられる。

よってklotho遺伝子以外の他の老化に関わる遺伝子が存在している可能性が十分考えられるが、klotho遺伝子と上述のヒト由来のklothoホモログ遺伝子以外には老化抑制遺伝子は未だ知られていない。

30

#### 発明の開示

老化に関与する遺伝子の機能が失われることで早期老化症状が発症するならば、該遺伝子機能を補う、即ち、該遺伝子のコードする蛋白質産物を投与する、あるいは遺伝子治療的に発現させるという治療法が有用である。また該遺伝子産物と相互作用する薬剤や、該遺伝子の発現を調節できる薬剤は極めて有用である。更に、遺伝的早期老化症以外の老化においても、老化を制御することができれば、老化と密接に関連して現れる種々の成人病の治療、予防に用いることができる。

同時にこのような薬剤の動物における評価系は薬剤の開発上欠くべからざる要素であり、モデル動物、特に該遺伝子が欠損または一部改変された動物は、このような薬剤開発上非常に有用である。

40

本発明は上記の早期老化症の治療法、老化に関与する遺伝子の発現を調節する薬剤とその探索法、老化に伴う成人病等の治療、予防、診断に有効な薬剤や方法、該薬剤の開発に必要な老化モデル動物を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、ヒト由来であるklotho遺伝子ホモログと相同性が高い、klotho遺伝子とは異なる老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするDNAを取得し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の(1)~(40)に関する。

(1) 配列番号1、2および3記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する老化を抑制する活性を有するポリペプチド。

50

- (2) 配列番号 1、2 および 3 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列において一個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつ老化を抑制する活性を有するポリペプチド。
- (3) (1) または (2) 記載のポリペプチドをコードする DNA。
- (4) 配列番号 4 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の塩基配列で表される DNA。
- (5) (4) 記載の DNA から選ばれる DNA において一個以上の塩基が欠失、置換もしくは付加した塩基配列を有する DNA であり、かつ老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードする DNA。
- (6) (3) ~ (5) のいずれか 1 項に記載の DNA から選ばれる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であり、かつ老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードする DNA。 10
- (7) (3) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の DNA から選ばれる DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。
- (8) (1) または (2) 記載のポリペプチドを認識する抗体。
- (9) (1) または (2) 記載のポリペプチドを含有する早期老化症または成人病治療薬。
- (10) (1) または (2) 記載のポリペプチドを含有する老化抑制薬。
- (11) (8) 記載の抗体を用いる、(1) または (2) 記載のポリペプチドの免疫学的定量法。 20
- (12) (11) 記載の定量法を用いる老化診断法。
- (13) (3) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の DNA を含有する、早期老化症または成人病治療用の遺伝子治療用ベクター。
- (14) (3) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の DNA を含有する、老化抑制用の遺伝子治療用ベクター。
- (15) (7) 記載の組換え体 DNA を保有する形質転換体。
- (16) (7) 記載の組換え体 DNA を保有する形質転換体を培養液中で培養し、該組換え体 DNA がコードするポリペプチドを該培養液中に生成蓄積させ、該培養液より該ポリペプチドを採取することを特徴とする (1) または (2) 記載のポリペプチドの製造法。
- (17) (1) または (2) 記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、被験試料より (1) または (2) 記載のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、 (1) または (2) 記載のポリペプチドに対するリガンドの探索法。 30
- (18) (17) 記載の方法により得られるリガンド。
- (19) [a] (1) または (2) 記載のポリペプチドと (18) 記載のリガンドを接触させた場合と [b] (1) または (2) 記載のポリペプチドと (18) 記載のリガンドおよび被験化合物とを接触させた場合との比較を行うことを特徴とする、(1) または (2) 記載のポリペプチドと (18) 記載のリガンドの特異的な結合を阻害する化合物の探索法。
- (20) (19) 記載の方法により得られる化合物またはその薬理的に許容される塩。
- (21) (1) または (2) 記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、被験試料より (1) または (2) 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増強させる化合物を選択することを特徴とする、(1) または (2) 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増強させる化合物の探索法。 40
- (22) 発現の増強を、(11) 記載の定量法を用いて検出することを特徴とする、(21) 記載の探索法。
- (23) 発現の増強を、(1) または (2) 記載のポリペプチドをコードする mRNA 量を測定することにより検出することを特徴とする、(21) 記載の探索法。
- (24) (21)、(22) および (23) のいずれか 1 つに記載の探索法により得られる化合物またはその薬理的に許容される塩。
- (25) (1) または (2) 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結された DNA を含むプラスミドで形質転換された形質 50

転換体と被験試料とを接触させ、被験試料より(1)または(2)記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増強させる化合物を選択することを特徴とする、(1)または(2)記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増強させる化合物の探索法。

(26)(25)記載の転写を制御する領域が、配列番号7記載の塩基配列において塩基番号1~2177で表わされる塩基配列を有するDNAであることを特徴とする(25)記載の探索法。

(27)(25)または(26)記載の探索法により得られる化合物またはその薬理的に許容される塩。

(28)(20)、(24)および(27)のいずれか1項に記載の化合物またはその薬理的に許容される塩を含有する早期老化症または成人病の治療薬。

(29)(20)、(24)および(27)のいずれか1項に記載の化合物またはその薬理的に許容される塩を含有する老化抑制薬。

(30)(3)~(6)のいずれか1項に記載のDNAを含むDNAを用いる家畜の改良法。

(31)(3)~(6)のいずれか1項に記載のDNAを過剰に発現させることを特徴とする(30)記載の家畜の改良法。

(32)(3)~(6)のいずれか1項に記載のDNAを含む遺伝子の全部または一部を欠損または置換することにより、老化を抑制する活性を有するポリペプチドの発現の量、時期または組織特異性が変化した遺伝子欠失または置換非ヒト動物。

(33)発現量の変化が、発現が低下または発現しない変化である(32)記載の遺伝子欠失または置換非ヒト動物。

(34)非ヒト動物が非ヒトほ乳類動物であることを特徴とする(32)または(33)記載の動物。

(35)非ヒトほ乳動物がマウスであることを特徴とする(33)記載の動物。

(36)(32)~(35)のいずれか1つに記載の動物、あるいは該動物の臓器、組織または細胞と被験化合物とを接触させ、被験化合物より早期老化症または成人病治療薬を選択することを特徴とする早期老化症または成人病治療薬の探索法。

(37)(32)~(35)のいずれか1つに記載の動物、あるいは該動物の臓器、組織または細胞と被験化合物とを接触させ、被験化合物より老化抑制薬を選択することを特徴とする老化抑制薬の探索法。

(38)(36)または(37)記載の方法により得られる化合物またはその薬理的に許容される塩。

(39)(38)記載の化合物またはその薬理的に許容される塩を含有する早期老化症または成人病の治療薬。

(40)(39)記載の化合物またはその薬理的に許容される塩を含有する老化抑制薬。

本発明のDNAは、老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするDNAであり、例えば、

(1)配列番号1、2および3記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA、

(2)配列番号1、2および3記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつ老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

(3)配列番号4、5または6記載の塩基配列で表されるDNA、

(4)配列番号4、5または6記載の塩基配列で表されるDNAの塩基配列において一個以上の塩基が欠失、置換もしくは付加した塩基配列を有し、かつ老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

(5)(1)~(4)のいずれか1つから選ばれるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするDNA、をあげることができる。

10

20

30

40

50

上記においてストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするDNAとは、老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするDNAまたはその染色体遺伝子断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザン・プロット・ハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0 MのNaCl存在下、42~68 でハイブリダイゼーションを行った後、0.1倍~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、42~68 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition. (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John and Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、DNA cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]、FASTA [Method in Enzymology, 183, 63 (1990)]等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号1、2、および3に記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、更に好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

本発明のポリペプチドとして、上述のDNAによりコードされるポリペプチドをあげることができ、具体的には、配列番号1、2および3に記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは配列番号1、2および3に記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列において一個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつ老化を抑制する活性を有するペプチド等をあげることができる。

上記において1個以上のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の方法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されることを意味し、例えば1~20個、好ましくは1~15個、より好ましくは1~5個の任意の数のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をあげることができる。

ポリペプチドのアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつ老化を抑制する活性を有するペプチドは、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、WO 85/00817、Nature, 316, 601 (1985)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載の方法に準じて該ポリペプチドをコードするDNAに含まれる塩基を欠失、置換または付加することで得られる変異DNAを用いて調製することができる。

本発明の老化抑制ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAは、本発明のDNAから選ばれるDNAをモレキュラー・クローニング第2版記載の方法に従ってベクターに連結することで得られる。

本発明のポリペプチドを製造する方法は、上記方法により作製した組換え体DNAを用いてモレキュラー・クローニング第2版記載の方法に従って形質転換された細胞を、該細胞

10

20

30

40

50

が生育し得る適当な培養液中で培養し、該培溶液中に配列番号 1、2 または 3 記載のポリペプチドを蓄積させ、該培溶液から該ポリペプチドを採取する方法をあげることができる。また該培溶液からポリペプチドを採取するには、ポリペプチドを可溶化後、イオン交換、ゲルろ過あるいは疎水性クロマトグラフィー法等、または該クロマトグラフィー法を組み合わせるにより単離精製する方法があげられる。

本発明の抗体としては、上記発明のポリペプチドを認識する抗体をあげることができる。上記発明の DNA を連結する遺伝子治療用のベクター DNA としては、レトロウィルスベクター、アデノウィルスベクターまたは該ウィルスベクターの誘導體など、本発明の DNA から選ばれる DNA を動物細胞内に導入し、発現させることができるベクターをあげることができる。

10

本発明のリガンドとは、本発明のポリペプチドと特異的に結合する物質のことを意味し、本発明のポリペプチドと特異的に結合する物質であればいずれも本発明のリガンドとして用いることができる。

本発明のポリペプチドから選ばれるポリペプチドの発現を増強させる化合物としては、該ポリペプチドをコードする DNA の転写量を特異的に増大させる物質をあげることができる。

本発明の遺伝子改変非ヒト動物としては、ヒト以外の動物であればいかなる動物でもよいが、好ましくはほ乳動物、例えばウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ハムスター、モルモット、マウス、ラットなどが用いられる。特にゲッ歯類はライフサイクルが比較的短く、また繁殖が容易であることからモデル動物としては好ましく、とりわけラット、マウスが好ましい。該動物を用いて作製される遺伝子改変非ヒト動物は、本発明の DNA、および該 DNA を含む染色体遺伝子を用いて、本発明の老化を抑制する作用を有するポリペプチドをコードする DNA を含む遺伝子の全部あるいは一部が欠損あるいは置換した遺伝子を有する胚性幹細胞クローンを作成し、キメラ法によって該胚性幹細胞クローンと正常細胞を掛け合わせることでキメラ個体を作成後、該キメラ個体と正常個体を掛け合わせるにより、すべての細胞の該 DNA に変異を有する個体を得たのち、該個体同士の掛け合わせにより相同染色体双方に変異の入ったホモ個体を得る方法により作成できる。本発明の DNA を含む染色体 DNA としては配列番号 7 記載の塩基配列で表される DNA を含む図 1 に記載された染色体遺伝子を断片をあげることができる。このようにして作製された、老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子に変異を有する遺伝子を保持する個体は、本発明の老化を抑制する活性を有するポリペプチドを発現できず、老化モデル動物として有用である。

20

30

本発明の遺伝子改変非ヒト動物を用いた早期老化症治療薬、成人病治療薬、および老化抑制薬の探索法には上述の老化モデル動物を用いる方法があげられる。

具体的には、該動物を被験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較することにより、該化合物の効果を該動物の各器官、組織、細胞等の変化または早期老化症、成人病若しくは老化症状の病態等の変化を観察することにより行うことができる。該動物を被験化合物で処理する方法としては、該動物に経口投与する、または静脈注射等により投与する方法等があげられるが、とくにこれらの方法に限られることはなく、用いられる試験化合物の性質により適宜選択することができる。

40

1) 老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードする DNA のクローン化  
 (1) 老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードする DNA 断片のクローン化  
 老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードする DNA 断片は、WO 98/29544 記載の k l o t h o 遺伝子等の塩基配列情報を基に作製されるプライマーを用い、PCR 法 [ P C R P r o t o c o l , H u m a n a P r e s s ( 1 9 9 3 ) ] により以下の方法で取得することができる。プライマーとしては、例えば WO 98/29544 記載の p R Y H H 0 2 にコードされるヒト膀胱由来老化抑制遺伝子の塩基配列を基に作製したプライマーをあげることができ、たとえば配列番号 9 および配列番号 10 に示した塩基配列を有するプライマーのセットをあげることができる。このプライマーセットを用い、染色体 DNA を鋳型として PCR 反応を行い、遺伝子断片を増幅する。染色体 DNA

50

としては、動物由来の染色体DNAをあげることができ、例えばマウス由来の染色体DNAをあげることができる。PCR反応の条件は、設計されたプライマーを用いたPCR法により特異的な増幅断片を与える条件であれば特に制限されない。例えば配列番号9および10に記載の塩基配列からなるDNAを用い、97で10分間、[94で1分間、65(1サイクルごとに0.5ずつ低下)で1分間、72で1分間]のサイクルを20回、(94で1分間、65で1分間、72で1分間)のサイクルを20回、72で5分間、その後4で保持という条件をあげることができる。PCRの条件は、該PCRに用いられるTaqポリメラーゼの性質にあわせて適宜変更することが好ましい。該PCR法により増幅したDNA断片の塩基配列を、例えば、サンガー(Sanger)らのジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463(1977)]あるいは、塩基配列自動分析装置、例えば、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製373A・DNAシーケンサー(Sequencer)等を用いて決定する。上記方法で決定された老化を抑制する活性を有するポリペプチドの一部をコードするDNAの塩基配列として、例えば配列番号8に記載された塩基配列をあげることができる。また該染色体遺伝子断片の塩基配列とWO 98/29544記載のpRYHH02にコードされるヒト膵臓由来老化抑制遺伝子の塩基配列と比較することにより、本染色体遺伝子断片は老化抑制遺伝子を含むDNAであることを確認することができる。

10

(2) 染色体遺伝子コスミドライブラリーからの老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするDNA断片のクローン化

20

上記(1)で取得した、老化を抑制する活性を有するポリペプチドの一部をコードするDNAを用いて、該DNA断片を含む、より長い染色体遺伝子断片を、例えば染色体遺伝子コスミドライブラリーから(1)で取得した該DNA断片を含むコスミドクローンを選択することにより取得することができる。

該選択法としては、(1)で取得した染色体DNA部分断片をプローブにしたコロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第二版記載)等、あるいは(1)で取得した染色体DNA部分断片の塩基配列から選ばれる配列を有する合成DNAをプライマーにしたPCRを利用した方法等があげられる。

PCRを利用した具体的方法としては以下に示す方法があげられる。

30

(1)で取得した配列番号8記載の染色体DNA断片の塩基配列から選ばれる配列を有するプライマーを合成する。プライマーとしては例えば配列番号11および配列番号12記載の塩基配列を有するプライマーのセットをあげることができる。該プライマーセットを用いてPCR法により染色体遺伝子コスミドライブラリーをスクリーニングする。染色体遺伝子コスミドライブラリーはモレキュラー・クローニング第2版記載の方法により作製することもできるが、市販の染色体遺伝子コスミドライブラリー(例えばKURABO社製)を用いることもできる。取得される染色体DNAコスミドライブラリーからPCRにより該遺伝子を含むクローンを選択する具体的な方法としては、該プライマーを用いたPCRにより増幅断片を与えるコスミドクローンを選択することにより行われる。PCR反応の条件は、該プライマーを用いたPCR反応により、特異的なDNA増幅を増幅できる条件であれば特に限定されない。

40

次に、上記PCR反応によって増幅断片を与えるクローンに含まれる染色体DNAについて制限酵素地図を作成し、(1)で取得した染色体部分断片をプローブとして用いたザンハイブリダイゼーション法を組み合わせることにより(1)でクローン化した染色体DNA部分断片の位置、すなわち該染色体部分断片(エクソン領域)を含んだ制限酵素切断断片を同定できる。マウスの場合には、第1図に示すようなマウス染色体DNAの制限酵素地図を常法にしたがって作製できる。次に該マウス染色体DNAを適当な制限酵素で消化したDNA断片に対し、配列番号8記載の塩基配列からなるDNA断片をプローブとしたザン解析を行い、該マウス染色体DNA上における配列番号8記載のDNAの位置を特定することで、エクソン部位が決定できる(第1図参照)。該エクソン領域を含む染色

50

体DNA断片について、(1)記載の常法により部分塩基配列を決定し、ヒト臍臓由来老化抑制遺伝子と相同性を比較することにより、コスミドライブラリーから選択したコスミドクローンに含まれるマウス染色体DNA断片は、マウス老化抑制遺伝子を含む断片であることを確認する。該部分塩基配列の例として配列番号7に示す塩基配列をあげることができる。他の動物についても同様の方法を用いて、老化を抑制する活性を有するポリペプチドの一部をコードするDNAを含む染色体DNA断片を取得することができる。

該染色体DNA断片が挿入されたプラスミドpEMRYHH02-S10を保有する大腸菌EMRYHH02-S10はFERM BP-6935として、平成11年11月10日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)に寄託されている。

(3) 老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするcDNAのクローニング  
老化を抑制する活性を有するポリペプチドをコードするcDNAをクローニングする方法としては、上記(2)に記載の方法により同定された、老化を抑制する活性を有するペプチドの一部をコードする、染色体DNA上のエクソン部分の塩基配列から選ばれる配列を有するDNAをプローブにしたサザンハイブリダイゼーションまたはブークハイブリダイゼーションによりcDNAライブラリーをスクリーニングする方法、該染色体DNA上のエクソン部の配列をもとにプライマーを設計し、PCRによりcDNAライブラリーからスクリーニングする方法等があげられる。

PCRを用いる方法としては、例えば配列番号7記載の塩基配列を有するDNAに含まれる老化抑制遺伝子のエクソン部分の塩基配列をもとにプライマーセットを作成し、cDNAライブラリーをPCR法によりスクリーニングする方法があげられる。プライマーは該老化抑制遺伝子のエクソン中の配列を特異的に増幅できればどのような配列、組み合わせでもよいが、好適には配列番号13および配列番号14記載のDNAがあげられる。cDNAライブラリーは該プライマーセットで特異的に増幅断片が出現するもの、つまり、該老化抑制遺伝子を発現している組織であれば限定されない。マウスの場合には19日齢胚を用いて作製されるものがあげられる。cDNAライブラリーの作製方法は、該胚を用いてモレキュラー・クローニング第2版記載の方法によっても作製可能であるが、市販のものを購入してもよい。市販のcDNAライブラリーからのPCRによるスクリーニング法の具体的好適な例として、マウスの場合、19日齢胚ライブラリーをマイクロタイタープレートのウェルに小分割したものをを用いた方法をあげることができる(RAPID-SCREEN<sup>TM</sup> cDNA LIBRARY PANELS (OriGene Technologies社製))。

配列番号13および配列番号14記載の塩基配列を有するプライマーのセットを用いた該タイタープレートのウェル中の試料に対するPCRにより、増幅断片が認められたウェルに対応するライブラリーのサブプールをさらにPCRによりスクリーニングする。PCRの条件は、用いたプライマーに特異的な増幅断片を与える条件であれば特に限定されないが、好適には配列番号13および配列番号14記載のプライマーセットを用いた場合、95で9分間、(95で30秒間、65で30秒間、72で30秒間)の反応サイクルを33回、72で5分間保温の温度条件をあげることができる。つぎに陽性ウェル、すなわち増幅断片を与えたウェル中のcDNAを含有する大腸菌のコロニーを寒天培地上に形成させた後、配列番号13および配列番号14記載の塩基配列を有するプライマーセットを用いたコロニーPCR法により、増幅断片が認められるコロニーを選択し、含有するプラスミドを回収し、該プラスミドに含まれるcDNA部分の遺伝子配列を(1)記載の常法により決定する。

このようにして決定された老化抑制遺伝子配列として、例えば、配列番号4、5または6に示された配列を有するDNA等をあげることができる。配列番号4記載のDNAを有するプラスミドpEMRYHH02-F1を含有する大腸菌EMRYHH02-F1は、FERM BP-6934として、配列番号6記載のDNAを有するプラスミドpEMRYHH02-T1を含有する大腸菌EMRYHH02-T1はFERM BP-6936としてそれぞれ平成11年11月10日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国

10

20

30

40

50

茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)に寄託されている。

上記老化抑制遺伝子のコードするポリペプチドとしては、例えば、配列番号1、2または3に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをあげることができる。

## 2) 老化抑制ポリペプチドの生産

上記のようにして得られる老化抑制遺伝子を宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するためには、モレキュラー・クローニング第二版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体DNAを造成し、該ベクターを該ベクターに適合した宿主細胞中に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養液中で培養し、該培溶液に本発明のポリペプチド蓄積せしめることにより製造できる。

宿主細胞としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エッシャーヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属、シュードモナス属、パチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する原核生物、クルイペロミセス属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株や動物細胞宿主等をあげることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込みが可能で、老化抑制遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、老化抑制遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、老化抑制遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(いずれもBoehringer mannheim社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200[*Agric. Biol. Chem.*, 48, 669(1984)]、pLSA1[*Agric. Biol. Chem.*, 53, 277(1989)]、pGEL1[*Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 82, 4306(1985)]、pBluescript(STRATAGENE社)、pTrs30(FERM BP-5407)、pTrs32(FERM BP-5408)、pGHA2(FERM BP-400)、pGKA2(FERM B-6798)、pTerm2(特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pKK233-2(Pharmacia社製)、pGEX(Pharmacia社製)、pETシステム(Novagen社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、t<sub>r</sub>pプロモーター(Pt<sub>r</sub>p)、l<sub>a</sub>cプロモーター(Pl<sub>a</sub>c)、P<sub>L</sub>プロモーター、P<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>l<sub>e</sub>tI</sub>プロモーター、P<sub>S<sub>E</sub></sub>プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPt<sub>r</sub>pを2つ直列させたプロモーター(Pt<sub>r</sub>p×2)、t<sub>a</sub>cプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャイン-ダルガノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エッシャーヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、プレバクテ

10

20

30

40

50

リウム属、シュードモナス属、バチルス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefacines、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354等をあげることができる。

10

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法 (特開昭 63-248394)、Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等をあげることができる。

20

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) pHS19、pHS15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

30

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法等をあげることができる。

40

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pAS3-3 (特開平2-227075)、pcDM8〔Nature, 329, 840 (1987)〕、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製) pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAGE210等を例示することができる。

50

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ヒトCMV）のIE（immediate early）遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ナマルバ細胞、HBT5637（特開昭63-299）、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133（1990）〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413（1987）〕、Virology, 52, 456（1973）に記載の方法等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

10

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル（Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual）、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47（1988）等に記載された方法によって、本発明のポリペプチドを発現することができる。

20

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、本発明のポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにInvitrogen社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス（Autographa californica nuclear polyhedrosis virus）などを用いることができる。

30

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21〔バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー（W. H. Freeman and Company）、ニューヨーク（New York）、（1992）〕、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh5（Invitrogen社製）等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413（1987）〕等をあげることができる。

40

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

本発明のDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

該ポリペプチド製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合

50

、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含出し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地[The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)]、EagleのMEM培地[Science, 122, 501(1952)]、DMEM培地[Virology, 8, 396(1959)]、199培地[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH6～8、30～40、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社製)、Sf-900 I I SFM培地(Gibco BRL社製)、ExCell 400、ExCell 405(いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium[Nature, 195, 788(1962)]等を用いることができる。

pH6～7、培養温度25～30がよく、培養時間は、通常1～5日間である。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明のポリペプチド製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離精製するには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る

10

20

30

40

50

。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-セファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、上記方法により発現させたポリペプチドを、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易（Advanced chem Tech社製）、パーキンエルマー・ジャパン（Perkin-Elmer社製）、ファルマシアバイオテック（Pharmacia Biotech社製）、アロカ（Protein Technology Instrument社製）、クラボウ（Synthecell-Vega社製）、日本パーセプティブ・リミテッド（PerSeptive社製）、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

### 3) 老化抑制ポリペプチドを認識する抗体の生産

#### (1) ポリクローナル抗体の作製

ウサギ、ヤギまたは3~20週令のラット、マウスもしくはハムスターに、上述2)で取得される本発明の老化抑制ポリペプチド全長または部分断片精製標品（抗原）を、50~100 $\mu$ g/匹程、該動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント〔例えば、フロインドの完全アジュバント（Complete Freund's Adjuvant）または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど〕とともに投与する。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法（ELISA法）：医学書院刊 1976年、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory（1988）〕などで確認する。

免疫に用いた抗原に対し、該血清が十分な抗体価を示したウサギ、ヤギ、マウス、ラットまたはハムスターより血清を取得し、該血清より、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析法、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラムあるいはゲルろ過カラム等を用いたクロマト法等の常法を用いて精製抗体を取得する。

#### (2) モノクローナル抗体の作製

##### (a) 抗体産性細胞の調製

免疫に用いた老化抑制部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rp

10

20

30

40

50

mで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス - 塩化アンモニウム緩衝液 (pH 7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

#### (b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。たとえば、8 - アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髄腫細胞株 P3 - X63 Ag8 - U1 (以下、P3 - U1と略す) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0 - Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3 - X63 - Ag8653 (653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3 - X63 - Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)]等を用いることができる。これらの細胞株は、8 - アザグアニン培地 [RPMI - 1640培地にグルタミン (1.5 mmol/L)、2 -メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5}$  mol/L)、ジェンタマイシン (10  $\mu$ g/ml) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8 - アザグアニン (15  $\mu$ g/ml) を加えた培地で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を  $2 \times 10^7$  個以上用いる。

#### (c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1リットル、pH 7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髄腫細胞 = 5~10 : 1になるよう混合し、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37°Cで、 $10^8$  抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール - 1000 (PEG - 1000) 2 g、MEM 2 ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 ml を混合した溶液を 0.2~1 ml 添加し、更に1~2分間毎にMEM培地 1~2 ml を数回添加する。添加後、MEM培地を加えて全量が50 mlになるように調製する。

該調製液を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地 [正常培地にヒポキサンチン ( $10^{-4}$  mol/L)、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}$  mol/L) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}$  mol/L) を加えた培地] 100 ml 中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100  $\mu$ l / 穴ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37°Cで7~14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりAntibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988) 等に述べられている酵素免疫測定法により、老化抑制部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた老化抑制部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の (d) で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、老化抑制ポリペプチドに特異的に反応するものを抗老化抑制ポリペプチドモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し [1回目は、HT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを抗老化抑制ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

10

20

30

40

50

## (d) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristan) 0.5 ml を腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c) で取得した抗老化抑制ポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpm で5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清を、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析法、カプリル酸沈殿法 (Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988))、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラムあるいはセルロファインGSL2000 (生化学工業社製) を用いたカラムクロマト法等を用いて、IgGあるいはIgM画分を集め、精製モノクローナル抗体として使用する。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

## 4) モノクローナル抗体を用いた免疫細胞染色

附着細胞を用いて免疫細胞染色を行う場合には、予め下記の処理をすることにより、培養フラスコより剥がした細胞を用いることが好ましい。

即ち、培養附着細胞をPBS緩衝液で洗浄し、0.05%トリプシン、0.02% EDTA (エチレンジアミン4酢酸) を含むPBS緩衝液3 mlを加え、余分な溶液を除いた後、37、5分間インキュベートすることによりフラスコより細胞を剥がす(以下、この操作をトリプシン-EDTA処理と呼ぶ)。

浮遊細胞については培養細胞をそのまま用いることができる。

免疫細胞染色を行う細胞を免疫細胞染色用緩衝液(1% BSA、0.02% EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS)等に懸濁し、 $1 \sim 20 \times 10^5$  個ずつ丸底96穴プレートに分注する。

該プレートに、(c) で取得した抗老化抑制ポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清、(d) で取得した精製モノクローナル抗体、もしくは該モノクローナル抗体を公知の方法(酵素抗体法: 学際企画刊1985年)でビオチン標識した抗体を  $0.1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$  の濃度になるように免疫細胞染色用緩衝液あるいは10%動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて希釈したものを  $20 \sim 500 \mu\text{l}$  /穴となるように分注し、氷冷下で30分間放置する。

上記において、(c) で取得した抗老化抑制ポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清または(d) で取得した精製モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を洗浄後、FITCあるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは抗ラットイムノグロブリン抗体を  $0.1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$  程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を  $50 \sim 500 \mu\text{l}$  /穴ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートにストレプトアビジンを  $50 \sim 500 \mu\text{l}$  /穴ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を良く洗浄し、セルソーターにより解析する。

## 5) 老化抑制ポリペプチドの免疫沈降

本発明の老化抑制ポリペプチドを発現するCHO細胞あるいは昆虫細胞をシャーレ等の培養容器中で培養する。

該培養容器にPBSを添加し、細胞を洗浄する。

該培養容器に氷冷した1% Triton X100、 $20 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl、 $150 \text{ mmol/L}$  NaCl からなる緩衝液(以後、緩衝液1と呼ぶ)等の細

10

20

30

40

50

胞膜を可溶化する緩衝液を100～500 $\mu$ l添加し、氷上で30分間静置した後、5分間隔でゆっくり振動させ、可溶化処理する。

該処理液を1.5ml用遠心チューブに回収し、14,000rpmで30分間遠心分離する。

得られた上清に、上記で用いた緩衝液で平衡化させたプロテインG-セファロースもしくはプロテインA-セファロースを10～50 $\mu$ l添加し、4で1時間以上振盪した後、5,000rpmで2分間遠心分離し、上清を回収する。

該上清に、(c)で取得した抗老化抑制ポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清または(d)で取得した精製モノクローナル抗体を0.01～50 $\mu$ g/mlとなるように添加し、4で1時間以上振盪する。

10

該振盪液にプロテインG-セファロースもしくはプロテインA-セファロースを10～50 $\mu$ l添加し、4で1時間以上振盪後、5,000rpmで2分間遠心分離する。

得られた沈殿画分に200 $\mu$ lの上記の細胞膜を可溶化する緩衝液を添加し、沈殿を懸濁させる。同様の操作を3度以上繰り返し、沈殿画分を洗浄する。

該沈殿にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用サンプルバッファーを添加し、ヒートブロックを用いて加熱した後、SDS-PAGEを行う。

SDS-PAGE終了後、得られたゲル中のポリペプチドをPVDF膜等へ転写し、本発明の抗老化抑制部分断片ペプチドポリクローナル抗体等を用いたウエスタンブロッティング法等により老化抑制ポリペプチドを検出する。

6) 本発明の老化抑制ポリペプチドと特異的に結合するリガンドの検索および同定

20

本発明の老化抑制ポリペプチドと被験試料を接触させ、被験試料より本発明のポリペプチドと特異的に結合する物質を選択することによりリガンドを探索、同定することができる。

被験試料として、例えば、哺乳動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒトなど)の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物などを用いることができる。

例えば、尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物などを適当な希釈、濃縮、分画等を行って、本発明の老化抑制ポリペプチドに接触させ、細胞刺激活性などを指標にさらに分画することにより、最終的に単一のリガンドを単離することができる。

具体的には本来本老化抑制遺伝子を発現していない細胞と、該細胞に本老化抑制遺伝子を導入発現させた細胞の両細胞に被験試料を接触させ、例えば、細胞内カルシウム、cAMP、cGMP等の細胞内情報伝達分子濃度の変化、細胞内蛋白質のリン酸化、初期転写因子遺伝子の発現変化、細胞膜電位の変化、細胞内pHの変化、細胞外情報伝達分子の遊離、細胞の形態変化等、種々の細胞刺激活性を両細胞において測定し、両細胞における差異を詳細に比較、解析することにより、リガンドを探索し、同定することができる。

30

合成化合物、天然に存在するまたは人工的に合成された蛋白質、糖質、脂質およびそれらの修飾体、誘導体を、ラジオアイソトープ等により標識し、該標識化合物の、本発明の老化抑制ポリペプチド発現細胞、該細胞膜画分、もしくはマイクロタイタープレート等へ固層化した本発明の老化抑制ポリペプチドへの、結合量を測定することにより、本発明のリガンドであるか否かの同定が可能である。

40

また、本発明の老化抑制ポリペプチドまたはその部分改変体や部分ペプチドをBIAcore(Pharmacia Biotech社製)のセンサーチップに共有結合させ被験試料を接触させるという公知の方法[Nature, 368, 558(1994)]により、リガンドを探索し、同定することができる。

更に、標識した本発明の老化抑制遺伝子ポリペプチドまたは非標識の該ポリペプチドと該ポリペプチドに対する標識抗体を用いて、該ポリペプチドと特異的に会合するリガンドを以下の方法で探索し、同定することが可能である。

即ち、尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物などを適当な分画を行った後、ポリアクリルアミド電気泳動、アガロース電気泳動、二次元電気泳動、などの電気泳動や、HPLC等のカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等の手法によりさら

50

に分画し、本老化抑制遺伝子を発現している個体と発現していない個体、または本老化抑制遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞等の間における差異を詳細に比較、解析することにより、本老化抑制遺伝子の発現と特異的に相関して認められる（または消失する）バンドやスポット、ピークを特定する。

該バンド、スポット、ピークより、ブロッティングの手法を用いて、ゲルまたは薄層プレートからニトロセルロース膜、ナイロン膜、P V D F膜等の支持体に写し取った後、標識した本老化抑制遺伝子ポリペプチドまたは非標識の該ポリペプチドと該ポリペプチドに対する標識抗体を用いて、該ポリペプチドと特異的に結合するバンド、スポットを探索し、該バンド、スポットよりリガンドを抽出し、同定することができる。

7) 本発明の老化抑制ポリペプチドと本発明のリガンドとの特異的結合を阻害する化合物の探索および同定

本発明の老化抑制ポリペプチドと本発明のリガンドを接触させた場合と、本老化抑制ポリペプチド、本発明のリガンドおよび被験化合物を接触させた場合との比較を行うことにより、被験試料から、本老化抑制ポリペプチドとリガンドとの特異的結合を阻害する化合物（例えば蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、生体成分など）をスクリーニングすることができる。該スクリーニングにより得られる化合物には、リガンドの老化抑制ポリペプチドへの特異的結合を阻害し、老化抑制ポリペプチドの有する活性を阻害する活性を有する化合物（アンタゴニスト）、および、特異的結合を阻害するが、リガンドと同様の機能を有するまたは代替する活性を有する化合物（アゴニスト）が含まれる。

被験試料として、合成化合物、天然に存在するまたは人工的に合成された蛋白質、糖質、脂質およびそれらの修飾体、誘導體などの他に、例えば、哺乳動物（例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒトなど）の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物、さらに発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

該化合物のスクリーニング方法として、例えば、以下の方法をあげることができる。

本老化抑制遺伝子を導入発現させた細胞もしくは本来本老化抑制遺伝子を発現している細胞に本発明のリガンド単独、または本発明のリガンドと被験試料を接触させ、例えば、細胞内カルシウム、c A M P、c G M P等の細胞内情報伝達分子濃度の変化、細胞内蛋白質のリン酸化、初期転写因子遺伝子の発現変化、細胞膜電位の変化、細胞内p Hの変化、細胞外情報伝達分子の遊離、細胞の形態変化等、種々の細胞刺激活性をリガンド単独の場合と、リガンドと被験試料を接触させた場合とで比較することにより、本発明の老化抑制遺伝子ポリペプチドと本発明のリガンドの特異的結合を阻害する化合物を探索し、同定する方法をあげることができる。

また本発明のリガンドをラジオアイソトープ等によって標識し、該標識リガンドの本発明の老化抑制ポリペプチド発現細胞、該細胞膜画分またはマイクロタイタープレート等へ固着化した本発明の老化抑制ポリペプチドへの結合量を該標識を利用して測定し、リガンド単独の場合と、リガンドと被験試料を接触させた場合とで比較することにより、本発明の老化抑制遺伝子ポリペプチドとリガンドとの結合を阻害する化合物を探索し、同定することができる。

8) 本発明の老化抑制ポリペプチドと本発明のリガンドが結合した結果誘導される化合物の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現させた細胞と、該ポリペプチドを発現しない細胞のそれぞれに本発明のリガンドを接触させた場合と接触させない場合で、その培養上清、細胞、細胞質画分、細胞膜画分等についてポリアクリルアミド電気泳動、アガロース電気泳動、二次元電気泳動、などの電気泳動や、H P L C等のカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等を行い、各成分を分画し、各成分について比較を行うことにより、リガンドを接触させた場合に特異的、また該ポリペプチド発現に相関して特異的に現れる、または消失するバンド、スポット、ピーク等を同定し、該バンド、スポット、ピークより目的とする分子を取得することができる。

10

20

30

40

50

また、本発明のポリペプチドを発現している個体では該ポリペプチドとリガンドとの特異的結合が恒常的に生じていると考えられ、発現していない個体（具体的に好適な例としては本特許明細書記載の遺伝子破壊マウス）ではこの相互作用が生じないと考えられる。従って正常のマウスと本特許記載の早期老化マウスの種々の臓器、組織、体液、血液、尿等を適当な分画を行った後、ポリアクリルアミド電気泳動、アガロース電気泳動、二次元電気泳動、などの電気泳動や、HPLC等のカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等の手法により分画し、比較を行うことにより、両者で異なる挙動を示すバンド、スポット、ピーク等を探索し、該バンド、スポット、ピークより分子を回収し、該バンド、スポット、ピークより目的とする化合物を同定することができる。

9) 本発明の老化抑制ポリペプチドの発現を増強させる化合物（以下、発現増強化合物と略す）の探索および同定

(1) 本発明の老化抑制ポリペプチドを認識する抗体を用いた探索および同定

本発明の老化抑制ポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明の老化抑制ポリペプチドを認識する抗体を用いて、該ポリペプチドを定量することにより、その細胞中、細胞培養上清中に存在する発現増強化合物を探索、同定することができる。

本発明の老化抑制ポリペプチドを発現する細胞として、例えばマウス脾臓、胎児肝臓、乳腺由来の細胞をあげることができる。例えば胎児肝臓についていえば公知の方法（初代培養肝細胞実験法、学会出版センター刊、1987年）を用いて調製したものをを用いることができる。

被験試料として、合成化合物、天然に存在するまたは人工的に合成されたタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、糖質、脂質およびそれらの修飾体、誘導体などの他に、例えば、哺乳動物（例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒトなど）の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物、さらに発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等を挙げることができるが、それらに限定されない。

本発明の老化抑制ポリペプチドを発現する細胞を、例えば該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現した老化抑制ポリペプチド含量を、上記3)のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用い、上記4)の方法に準じて定量する。

被験試料を添加しない系と比較し、老化抑制ポリペプチド含量を増加させることのできた被験試料を探索することにより、発現増強化合物を同定することができる。

(2) 本発明の老化抑制遺伝子の転写産物の定量系を利用した探索および同定

本発明の老化抑制ポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明の老化抑制遺伝子の転写産物を定量することにより発現増強化合物を探索、同定することができる。

本発明の老化抑制ポリペプチドを発現する細胞および被験試料として、上記(1)記載のものを用いることができる。

本発明の老化抑制ポリペプチドを発現する細胞を、例えば該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現した老化抑制遺伝子の転写産物の量を、通常のノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーション法、RNAのドット・ブロット・ハイブリダイゼーション法、RT-PCR法などを用い定量することができる。

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよびRT-PCR法等に用いることのできるプライマーとして、本発明の老化抑制遺伝子断片をあげることができ、具体的には配列番号4、5または6記載のDNA配列から選ばれる配列を有するDNA断片を好適に用いることができる。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明の老化抑制遺伝子の転写産物含量を増加させることのできる被験試料を探索することにより、発現増強化合物を同定することができる。

(3) レポーター遺伝子を利用した探索および同定

本発明の老化抑制ポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域（以下、転写制

10

20

30

40

50

御領域と略す)の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体と被験試料とを接触させた後、レポーター遺伝子によりコードされたポリペプチドの発現量を定量することにより発現増強化合物を探索、同定することができる。

転写制御領域としては、配列番号7記載の塩基番号1 - 2177番の領域をあげることができる。また、該領域を適当な制限酵素を用い、適切な長さに切断した断片を転写制御領域として用いることができる。

レポーター遺伝子としては、該遺伝子の翻訳産物が細胞内で安定であり、該翻訳産物の存在量が容易に定量できるものであればいかなるものでも用いることができ、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -gal)、ルシフェラーゼ(Luc)、グリーンフルオレッセントプロテイン(GFP)をコードする遺伝子等をあげることができる。

被験試料として、上記(1)のものを用いることができる。

転写制御領域の下流に常法によりレポーター遺伝子を連結し、作製したプラスミドを用い、常法により宿主細胞を形質転換する。

該形質転換体を、例えば該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現したレポーター遺伝子の転写産物の量を、該転写産物に適した方法で検出、定量する。

検出、定量法として、CATの場合には、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、16章、60頁に記載の方法を、 $\beta$ -galの場合には、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、16章、66頁に記載の方法を、Lucの場合には、例えば、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4、遺伝子導入と発現・解析法、81(1994)に記載の方法を、GFPの場合には、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94, 4653(1997)記載の方法等をあげることができる。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明の老化抑制遺伝子の転写産物含量を増加させることのできた被験試料を探索することにより、発現増強化合物を同定することができる。10)老化抑制ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドを認識する抗体、本発明のリガンドおよび発現増強化合物の利用

(1)本発明の抗老化抑制ポリペプチド抗体を用いることにより、血液、臓器の一部、細胞等のサンプルでの老化抑制ポリペプチドの検出、定量を行うことができる。

具体的に好適な手法としてはマイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法などがあげられ、また病理組織切片を用いた免疫組織染色にも利用できる。従って該抗体は老化抑制ポリペプチド発現の低下に伴う早期老化症や種々の成人病の発生の可能性の診断に有用である。同様に該ペプチドを対象とした研究における研究用試薬としても有用である。

(2)本発明の老化抑制ポリペプチドの全長または部分断片を生体に投与することにより老化の抑制が可能である。従って老化の進行に密接に関連して生ずる種々の成人病、例えば動脈硬化、高血圧、骨粗鬆症等の治療薬、予防薬として有用である。また老化の抑制に基づく寿命の延長の効果にも有用である。

(3)本発明の老化抑制遺伝子をレトロウィルス、アデノウィルス等のウィルスベクターやその他のベクターに組み込み、遺伝子治療の方法により治療に用いることができる。

(4)本発明の老化抑制遺伝子を用いて、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、該遺伝子の発現量を測定し、老化、成人病を診断するとともに、該老化抑制遺伝子を老化抑制、成人病発症抑制に利用することができる。また、該老化抑制遺伝子の先天的な欠損により、老化が促進され、成人病を生じやすくなった個体を、該老化抑制遺伝子を用いたサザン・ブロット・ハイブリダイゼーションやPCR法あるいはSSCP法により検出し、該検出された個体の核酸配列情報を基に遺伝子診断を行うことができる。更に該老化抑制遺伝子は遺伝子研究用試薬としても極めて有用である。

(5)更に、本発明により提供される、目的とする家畜動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ等、由来の老化抑制遺伝子を相応する動物に投与するか、または

10

20

30

40

50

該遺伝子を遺伝子治療的に適当なウィルス等のベクターを用いて個体で発現させることにより、さらに該遺伝子を強発現する細胞の核を用いた核移植によるクローン作成法により目的とする家畜の寿命を延長し、また老化を抑制することが可能である。これにより長期に渡り状態の良い飼育と、乳や卵や産子の長期に渡る採取が可能となる。もしくは受精卵に該遺伝子を導入し、体中全ての細胞の染色体に該遺伝子を挿入し、発現させる、いわゆるトランスジェニック動物を作製することにより、同様の効果が期待でき、畜産分野でも育種の面から有用性が高いと考えられる。

(6) 本発明の本老化抑制ポリペプチドは、該ポリペプチドに特異的に結合するリガンドを探索し、決定するための試薬として有用である。

(7) 本発明の老化抑制ポリペプチドと本発明のリガンドとを用いて、該ポリペプチドとリガンドの特異的結合を阻害する化合物の探索および同定に用いることができる。

(8) 本発明の老化抑制ポリペプチドと本発明のリガンドを利用し、該ポリペプチドとリガンドが結合した結果誘導される分子を探索、同定することができる。

(9) 本発明のリガンド、本発明の老化抑制ポリペプチドと本発明のリガンドとの特異的結合を阻害する化合物、本発明のポリペプチドとリガンドが結合した結果誘導される分子は、本発明の老化抑制遺伝子ポリペプチドの老化抑制機能を代替もしくは補助すると考えられ、これら分子を含む薬剤は早期老化症治療薬、成人病治療薬、老化抑制薬として有用である。

(10) 早期老化症治療薬、成人病治療薬、老化抑制薬として有用である本発明の老化抑制ポリペプチドをコードする老化抑制遺伝子の発現を増加させる化合物(発現増強化合物)は、老化抑制ポリペプチド同様、老化の抑制、成人病の治療、予防に有用である。

11) 老化抑制遺伝子が欠損または置換した遺伝子改変非ヒト動物の作製法と利用法

(1) 老化抑制遺伝子の全部或いはその一部が欠損または置換した、不活性型または置換型老化抑制遺伝子を含むベクターを用い胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の老化抑制遺伝子を公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 295(1987)、Cell, 51, 503(1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作成することができる〔Nature, 350, 243(1991)〕。

具体的には第1図または配列番号7で示した染色体遺伝子断片を用いることができる。ターゲティングベクターは以下のように造成できるが、これに限定するものではない。

第1図のSacI-BglII断片(short arm: 約2.3kb)、PGKneo<sup>r</sup>カセット〔PGKプロモーター-ネオマイシン耐性遺伝子-ウシ成長ホルモン遺伝子ポリアデニレーションシグナル配列からなるネオマイシン耐性遺伝子発現ユニット、Cell, 64, 693(1991)〕、第1図のSphI-SphI断片(long arm: 約4.3kb)、MC1/DT-Aカセット〔MC1プロモーターとジフテリア毒素A鎖からなるジフテリア毒素A鎖発現ユニット、Analytical biochemistry, 214, 77(1993)〕を第1図のTargeting vectorと示したように連結した断片を含有するpBluescriptISK(-)を造成する。該ベクターをKpnIなどで切断し線状化した後、TT2細胞〔Analytical Biochemistry, 214, 70(1993)〕などのES細胞株に導入する。G418耐性を有するクローンよりPCR法またはサザンハイブリダイゼーション法により、相同組換えを起こして本老化抑制遺伝子のエクソン1部分が破壊されたクローンを選択する。

このようにして作成した胚性幹細胞クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の本老化抑制遺伝子に変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体を得ることができる。

このようにして動物個体において、老化抑制遺伝子の任意の位置へ変異の導入が可能であ

10

20

30

40

50

る。例えば老化抑制遺伝子の翻訳領域中への塩基置換、欠失、挿入等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらに Cre-loxP系〔J. Clin. Invest., 98, 600 (1996)〕との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。このような例としては脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 1317 (1996)〕や Creを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335 (1997)〕が知られている。従って本発明の老化抑制遺伝子についてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や、発現制御領域に有する動物個体を作成することが可能である。このような動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、老化と老化に伴って生ずる成人病等の種々の疾患の症状を誘導することができる。従って老化や成人病等の種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

発明を実施するための最良の形態

以下実施例を示すが、実施例中、遺伝子操作的手法は特に断らない限り公知のモレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法により行った。

実施例1 老化抑制遺伝子マウスカウンターパート染色体遺伝子のクローン化

(工程1) マウス老化抑制遺伝子染色体断片のクローン化 マウス染色体DNA 100 ng、配列番号9に示した塩基配列を有するセンスプライマー 10 μmol/Lを1 μl、配列番号10に示した塩基配列を有するアンチセンスプライマー 10 μmol/Lを1 μlと、10×PCR用緩衝液(酵素に添付してあるものを使用) 4 μl、2.5 mmol/L dNTP 3.2 μlを混合し、水を加えて総量を40 μlとした後、Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製、5単位/μl) 0.5 μlを混合した。97 で10分間、[94 で1分間、65 (1サイクルごとに0.5 ずつ低下)で1分間、72 で1分間]のサイクルを20回、(94 で1分間、65 で1分間、72 で1分間)のサイクルを20回、72 で5分間、その後4 保持という条件でPCR反応を行った。アガロースゲル電気泳動により解析した結果、約0.3 kbの断片が認められたため、増幅断片をアガロースゲルから精製し、pT7Blue T-vector (Novagen社製)にDNAライゲーションキット ver. 2 (宝酒造社製)を用いて組み込んだ。方法はキットの説明書の指示に従った。この溶液を用い大腸菌XL1-Blue株を形質転換し、アンピシリン耐性を有する形質転換体を得た。該形質転換体からプラスミド抽出機PI-100(クラボウ社製)を用いてプラスミドを抽出し、ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem社製)を用い、塩基配列をDNAシーケンサー377〔Perkin Elmer社製〕を用いて決定したところ、ヒト老化抑制遺伝子と相同性を示す配列番号8記載の塩基配列を有するクローンを見出した。

(工程2) マウス老化抑制遺伝子染色体遺伝子のクローン化 工程1で単離したクローンの配列中に特異的かつ完全一致するプライマーとして配列番号11(配列番号8記載の塩基配列中、塩基番号31~58)および配列番号12(配列番号8記載の塩基配列中、塩基番号198~219の相補鎖)記載のDNAを合成した。配列番号11および12記載の塩基配列を有するプライマーセットを用い、129Svjマウス由来ES細胞株の染色体遺伝子BACライブラリーを検索し、このプライマーセットにより特異的なバンドが増幅される、すなわちマウス老化抑制遺伝子を含むBACクローン、clone 19348を単離した。clone 19348は約140 kbの挿入断片を有していた。

得られたクローンは、種々の制限酵素消化による解析並びに工程1で得られたクローン断片をプローブとしたサザン・プロットにより解析した。サザンプロット解析のプローブには、工程(1)で得られたクローン断片をDIG DNA labeling kit (

10

20

30

40

50

Boehringer mannheim社製)によりジゴキシゲニン(DIG)標識したものをを用いた。標識法はキット付属の説明書に従った。BACクローンは種々の制限酵素で切断し、アガロース電気泳動で分画した後、ナイロンメンブレンフィルターHybond N+(Amersham社製)にプロットングした。Boehringer mannheim社のプロトコール(DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids)に従って、DNAの変性、固定化、プローブとのハイブリダイズ、フィルターの洗浄を行った。ハイブリダイズ溶液は5×SSC、1%Blocking solution(DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids(ベーリンガー・マンハイム社製))、0.1%Sacrcosyl、0.02%SDSを含むものを用い、68℃で一晩行った。また、洗浄は振とうしながら、0.1%SDSを含む2×SSC中室温で10分間を2回行った後、0.1%SDSを含む0.1×SSC中で68℃で15分間を2回行った後、抗DIG抗体を用いたDIG検出キット(ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて、SacI消化した場合約10kbの断片上にプローブとハイブリダイズする領域が存在することが確認された。

10

そこでclone 19348をSacIで消化し、生ずる約10kbの断片をpBluescript SK(-)のSacI部位にクローン化した。該断片を種々の制限酵素で消化して、第1図に示す制限酵素地図を作製した。種々の制限酵素切断により生ずる断片のサブクローン化により、また同時にExo Mung Bean Deletion kit(Stratagene社製)を用いた逐次消化によるdeletion seriesを該キット添付の使用説明書に従い作成し、工程1に示した方法で塩基配列を決定した。その結果、第1図の制限酵素地図上左端から約4kbの範囲で塩基配列が決定でき、その中にはヒトRYHH02 cDNAと高い相同性を示す領域、すなわちエクソン1と考えられる領域が第1図に示す位置に特定できた。決定された塩基配列を配列番号7に記載した。従ってこの約10kb断片上にはマウス老化抑制遺伝子のエクソン1が含まれることが確認された。

20

#### 実施例2 マウス老化抑制遺伝子cDNAのクローン化

マウス老化抑制遺伝子cDNAのスクリーニングにはSwiss Webster mouse 19日齢胚 cDNA libraryのRAPID-SCREEN<sup>TM</sup> cDNA LIBRARY PANELS(OriGene Technologies社製)を配列番号13(配列番号7記載の塩基配列中、塩基番号2389~2411)および配列番号14(配列番号7記載の塩基配列中、塩基番号2951~2975の相補鎖)記載のプライマーセットを用いたPCR反応により行った。スクリーニング条件等は全てOriGene Technologies社のマニュアルに従った。すなわちマスタープレートの各ウェルのプラスミド溶液を用い、25μlの反応系で1×PCR緩衝液、0.2mmol/L各dNTPs、配列番号13記載の塩基配列を有するプライマー1μmol/L、配列番号14記載の塩基配列を有するプライマー1μmol/L、1.25U Ampli TaqR Gold DNA Polymerase(Perkin Elmer社製)の反応溶液組成、95℃で9分間、(95℃で30秒間、65℃で30秒間、72℃で30秒間)の反応を33サイクル、72℃で5分間の温度条件でPCR反応を行った。アガロースゲル電気泳動で解析した結果、6つのウェル由来の反応液に特異的な増幅バンドが検出されたため、該6ウェルに対応する96ウェルのサブプレートを購入し、同様にPCR反応を行い、最終的に2ウェルに陽性反応を見出した。該2ウェルに対応する大腸菌グリセロールストックをLB培地で1000倍に希釈した後、寒天培地上に塗布し、コロニーを出現させた。

30

40

コロニーPCR法により、出現したコロニーをランダムに検索し、得られた陽性コロニーからプラスミドを抽出した後、該プラスミドに含有されるcDNA部分の全塩基配列を決定した。得られた塩基配列を配列番号4, 5および6に、該塩基配列によりコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1, 2および3に示した。

#### 実施例3 老化抑制遺伝子の組織発現分布

50

WO 98/29544 記載の p R Y H H 0 2 にコードされるヒト腓膵由来老化抑制ポリペプチドは、k l o t h o 遺伝子にコードされているポリペプチドとアミノ酸配列で約 4 5 % の相同性を示すことから、k l o t h o ファミリーに属する老化抑制ポリペプチドである。

本発明の DNA にコードされる老化抑制ポリペプチドは、ヒト腓膵由来老化抑制ポリペプチドのマウスカウンターパートであり、k l o t h o 遺伝子がコードするポリペプチドと約 4 4 %、ヒト腓膵由来老化抑制ポリペプチドと 7 6 % の相同性を有することから、本発明の老化抑制ポリペプチドもまた k l o t h o ファミリーに属するポリペプチドであり、k l o t h o と類似の機能を有すると考えられる。

本発明の老化抑制ポリペプチドの機能を予測する上で、k l o t h o 遺伝子がコードするポリペプチドとヒト腓膵由来老化抑制ポリペプチドの組織発現分布を比較することは、有効な手段であると考えられる。

WO 98/29544 記載の p R Y H H 0 2 にコードされるヒト老化抑制遺伝子塩基配列をもとに、配列番号 1 5 記載の塩基配列からなる DNA および配列番号 1 6 記載の塩基配列からなる DNA を合成した。

一方、ヒト各種臓器由来の mRNA ( C l o n t e c h 社製 ) から一本鎖 c D N A の合成をキット ( S U P E R S C R I P T T M P r e a m p l i f i c a t i o n S y s t e m ; B R L 社製 ) を用いて行った。1  $\mu$  g の mRNA から一本鎖 c D N A を合成し、水で 2 4 0 倍希釈して P C R の鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ ( d T ) プライマーを用いた。m R N A としては、副腎、脳、尾状核、海馬、黒質、視床、腎、膵臓、脳下垂体、小腸、骨髄、扁桃腺、小脳、脳梁、胎児脳、胎児腎、胎児肝臓、胎児肺、心臓、肝臓、肺、リンパ節、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、脊髄、脾臓、胃、精巢、胸腺、甲状腺、気管、子宮の 3 5 種の臓器由来のものを用いた。

R T - P C R 反応は、一本鎖 c D N A ( 0 . 2 n g /  $\mu$  l ) 5  $\mu$  l、1 0  $\times$  E x - T a q 緩衝液 2  $\mu$  l、2 . 5 m m o l / L d N T P s 1 . 6  $\mu$  l、2 0  $\mu$  m o l / L の配列番号 1 5 記載の塩基配列を有するプライマー 1  $\mu$  l、2 0  $\mu$  m o l / L の配列番号 1 6 記載の塩基配列を有するプライマー 1  $\mu$  l、D M S O 1  $\mu$  l、E x - T a q ( 宝酒造社製 ) 0 . 1  $\mu$  l、H <sub>2</sub> O 8 . 3  $\mu$  l からなる溶液を 9 8 で 5 分間、( 9 4 で 3 0 秒間、6 5 で 1 分間、7 2 で 2 分間 ) の反応を 3 0 サイクル、7 2 で 1 0 分間という反応を行った。反応産物をアガロースゲル電気泳動にて解析し、生ずるバンドの強度により各組織での発現強度を分析した。

その結果、膵臓、胎児肝臓、乳腺の各組織において強い発現が認められ、尾状核、骨髄、肝臓、精巢で弱い発現が認められたが、その他の組織では調べた範囲で発現は確認されなかった。従ってヒト腓膵由来老化抑制遺伝子の発現は組織特異性が認められ、腎臓で強発現する k l o t h o 遺伝子とは明らかに異なる発現分布を示すことが明らかなことから、両者の生体内で担う機能は明らかに異なると考えられる。

従ってヒト腓膵由来老化抑制ポリペプチドとより高い相同性を有する本発明の老化抑制ポリペプチドもまた、その役割において k l o t h o とは異なる効果を有すると考えられる。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、動物の老化を抑制する新規ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含む染色体 DNA 断片、該ポリペプチドを認識する抗体、本発明のポリペプチドに対するリガンド、本発明のポリペプチドとリガンドとの特異的な結合を阻害する化合物、本発明の老化抑制ポリペプチドをコードする老化抑制遺伝子の発現を増加させる化合物、該化合物の探索法および該老化抑制遺伝子を欠損あるいは一部改変された動物の作製法と利用法を提供する。

「配列表フリーテキスト」

配列番号 9 - 配列の説明：合成 DNA

配列番号 1 0 - 配列の説明：合成 DNA

配列番号 1 1 - 配列の説明：合成 DNA

10

20

30

40

50

配列番号 1 2 - 配列の説明：合成 D N A  
 配列番号 1 3 - 配列の説明：合成 D N A  
 配列番号 1 4 - 配列の説明：合成 D N A  
 配列番号 1 5 - 配列の説明：合成 D N A  
 配列番号 1 6 - 配列の説明：合成 D N A

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO.,LTD 10

<120> Novel peptide, gene, antibody and recombinant animal

<130> 11259W01

<140>

<141>

<150> JP 99/329649

<151> 1999-11-19 20

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1043

<212> PRT

<213> mouse 30

<400> 1

Met Lys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe  
 1 5 10 15

Phe Ser Ser Asp Glu Arg Asn Thr Arg Ser Arg Lys Thr Met Ser Asn  
 20 25 30

Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val Leu Leu Arg  
 35 40 45 40

Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp Asp Lys Lys  
 50 55 60

Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr  
 65 70 75 80

Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala Phe Gln Val  
 85 90 95 50

Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp Arg  
 100 105 110

Tyr Val Tyr Ser His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp Arg Ser Thr  
 115 120 125

Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Phe Leu  
 130 135 140

Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro  
 145 150 155 160

Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg  
 165 170 175

Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr  
 180 185 190

Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly  
 195 200 205

Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr  
 210 215 220

Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His  
 225 230 235 240

Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala  
 245 250 255

Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn  
 260 265 270

Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asp Lys Asn Phe  
 275 280 285

Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp  
 290 295 300

Ile Glu Pro Asn Arg Thr Asp Asn Met Glu Asp Val Ile Asn Cys Gln  
 305 310 315 320

10

20

30

40



Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Val Thr Gly Asn Arg Leu Leu Tyr  
 545 550 555 560

Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ser Gln Cys Thr Asp  
 565 570 575

Tyr Val Ser Ile Lys Lys Arg Val Glu Met Leu Ala Lys Met Lys Val  
 580 585 590

Thr His Tyr Gln Phe Ala Leu Asp Trp Thr Ser Ile Leu Pro Thr Gly  
 595 600 605

Asn Leu Ser Lys Val Asn Arg Gln Val Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val  
 610 615 620

Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Val Phe Pro Met Val Thr Leu Tyr  
 625 630 635 640

His Pro Thr His Ser His Leu Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Ser Ser  
 645 650 655

Gly Gly Trp Leu Asn Met Asn Thr Ala Lys Ala Phe Gln Asp Tyr Ala  
 660 665 670

Glu Leu Cys Phe Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr  
 675 680 685

Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Met Tyr Asn Arg Thr Ser Asn  
 690 695 700

Asp Thr Tyr Arg Ala Ala His Asn Leu Met Ile Ala His Ala Gln Val  
 705 710 715 720

Trp His Leu Tyr Asp Arg Gln Tyr Arg Pro Val Gln His Gly Ala Val  
 725 730 735

Ser Leu Ser Leu His Cys Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Phe Val  
 740 745 750

Asp Ser His Trp Lys Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala  
 755 760 765

10

20

30

40

Trp Phe Ala Asp Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ser Val Met  
 770 775 780  
 Lys Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Asn Gln Arg Gly Leu Ser Ser Ser Val  
 785 790 795 800  
 Leu Pro Arg Phe Thr Ala Lys Glu Ser Arg Leu Val Lys Gly Thr Val  
 805 810 815  
 Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Ile His Lys  
 820 825 830  
 Gln Leu Asn Thr Asn Arg Ser Val Ala Asp Arg Asp Val Gln Phe Leu  
 835 840 845  
 Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro  
 850 855 860  
 Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp  
 865 870 875 880  
 Arg Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Leu Ala Leu Glu  
 885 890 895  
 Asp Asp Gln Ile Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Val Gln Glu Ala  
 900 905 910  
 Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala  
 915 920 925  
 Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr  
 930 935 940  
 Ser Asp Phe Arg Ala Lys Ser Ser Val Gln Phe Tyr Ser Lys Leu Ile  
 945 950 955 960  
 Ser Ser Ser Gly Leu Pro Ala Glu Asn Arg Ser Pro Ala Cys Gly Gln  
 965 970 975  
 Pro Ala Glu Asp Thr Asp Cys Thr Ile Cys Ser Phe Leu Val Glu Lys  
 980 985 990

10

20

30

40

Lys Pro Leu Ile Phe Phe Gly Cys Cys Phe Ile Ser Thr Leu Ala Val  
995 1000 1005

Leu Leu Ser Ile Thr Val Phe His His Gln Lys Arg Arg Lys Phe Gln  
1010 1015 1020

Lys Ala Arg Asn Leu Gln Asn Ile Pro Leu Lys Lys Gly His Ser Arg  
1025 1030 1035 1040

Val Phe Ser

10

<210> 2

<211> 1014

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 2

Met Ser Asn Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val  
1 5 10 15

Leu Leu Arg Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp  
20 25 30

Asp Lys Lys Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu  
35 40 45

Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala  
50 55 60

Phe Gln Val Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile  
65 70 75 80

Trp Asp Arg Tyr Val Tyr Ser His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp  
85 90 95

Arg Ser Thr Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu  
100 105 110

Asp Phe Leu Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg

20

30

40









1010

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 295

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 3

Met Lys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe 10  
 1 5 10 15

Phe Ser Ser Asp Glu Arg Asn Thr Arg Ser Arg Lys Thr Met Ser Asn  
 20 25 30

Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val Leu Leu Arg  
 35 40 45

Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp Asp Lys Lys 20  
 50 55 60

Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr  
 65 70 75 80

Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala Phe Gln Val  
 85 90 95

Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp Arg 30  
 100 105 110

Tyr Val Tyr Ser His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp Arg Ser Thr  
 115 120 125

Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Phe Leu  
 130 135 140

Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro 40  
 145 150 155 160

Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg  
 165 170 175

Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr  
 180 185 190

Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly  
 195 200 205

Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr  
 210 215 220

Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His  
 225 230 235 240

Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala  
 245 250 255

Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn  
 260 265 270

Leu Ile Lys Val Leu Tyr Ser Trp Leu Leu Thr Arg Ala Ser Glu Leu  
 275 280 285

Gly Gly Gly Val Leu Gly Gly  
 290 295

<210> 4

<211> 3129

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3129)

<400> 4

atg aag aca ggc tgt gca gca ggg tct ccg ggg aat gaa tgg att ttc 48  
 Met Lys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe 40  
 1 5 10 15

ttc agc tct gat gaa aga aac aca cgc tct agg aaa aca atg tcc aac 96  
 Phe Ser Ser Asp Glu Arg Asn Thr Arg Ser Arg Lys Thr Met Ser Asn  
 20 25 30

10

20

30

40

|   |     |    |
|---|-----|----|
| agg gca ctg caa aga tct gcc gtg ctg tct gcg ttt gtt ctg ctg cga | 144 |    |
| Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val Leu Leu Arg |     |    |
| 35 40 45  |     |    |
| <br>  |     |    |
| gct gtt acc ggc ttc tcc gga gac ggg aaa gca ata tgg gat aaa aaa | 192 |    |
| Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp Asp Lys Lys |     |    |
| 50 55 60  |     |    |
| <br>  |     |    |
| cag tac gtg agt ccg gta aac cca agt cag ctg ttc ctc tat gac act | 240 | 10 |
| Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr |     |    |
| 65 70 75 80   |     |    |
| <br>  |     |    |
| ttc cct aaa aac ttt tcc tgg ggc gtt ggg acc gga gca ttt caa gtg | 288 |    |
| Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala Phe Gln Val |     |    |
| 85 90 95  |     |    |
| <br>  |     |    |
| gaa ggg agt tgg aag aca gat gga aga gga ccc tcg atc tgg gat cgg | 336 |    |
| Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp Arg |     | 20 |
| 100 105 110   |     |    |
| <br>  |     |    |
| tac gtc tac tca cac ctg aga ggt gtc aac ggc aca gac aga tcc act | 384 |    |
| Tyr Val Tyr Ser His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp Arg Ser Thr |     |    |
| 115 120 125   |     |    |
| <br>  |     |    |
| gac agt tac atc ttt ctg gaa aaa gac ttg ttg gct ctg gat ttt tta | 432 |    |
| Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Phe Leu |     |    |
| 130 135 140   |     | 30 |
| <br>  |     |    |
| gga gtt tct ttt tat cag ttc tca atc tcc tgg cca cgg ttg ttt ccc | 480 |    |
| Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro |     |    |
| 145 150 155 160   |     |    |
| <br>  |     |    |
| aat gga aca gta gca gca gtg aat gcg caa ggt ctc cgg tac tac cgt | 528 |    |
| Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg |     |    |
| 165 170 175   |     |    |
| <br>  |     |    |
| gca ctt ctg gac teg ctg gta ctt agg aat atc gag ccc att gtt acc | 576 | 40 |
| Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr |     |    |
| 180 185 190   |     |    |
| <br>  |     |    |
| ttg tac cat tgg gat ttg cct ctg acg ctc cag gaa gaa tat ggg ggc | 624 |    |

|   |      |     |
|---|------|-----|
| Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly |      |     |
| 195   | 200  | 205 |
| tgg aaa aat gca act atg ata gat etc ttc aac gac tat gcc aca tac | 672  |     |
| Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr |      |     |
| 210   | 215  | 220 |
| tgc ttc cag acc ttt gga gac cgt gtc aaa tat tgg att aca att cac | 720  |     |
| Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His |      | 10  |
| 225   | 230  | 235 |
| 240   |      |     |
| aac cct tac ctt gtt gct tgg cat ggg ttt ggc aca ggt atg cat gca | 768  |     |
| Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala |      |     |
| 245   | 250  | 255 |
| cca gga gag aag gga aat tta aca gct gtc tac act gtg gga cac aac | 816  |     |
| Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn |      | 20  |
| 260   | 265  | 270 |
| ctg atc aag gca cat tcg aaa gtg tgg cat aac tac gac aaa aac ttc | 864  |     |
| Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asp Lys Asn Phe |      |     |
| 275   | 280  | 285 |
| cgc cct cat cag aag ggt tgg etc tcc atc acc ttg ggg tcc cat tgg | 912  |     |
| Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp |      |     |
| 290   | 295  | 300 |
| ata gag cca aac aga aca gac aac atg gag gac gtg atc aac tgc cag | 960  | 30  |
| Ile Glu Pro Asn Arg Thr Asp Asn Met Glu Asp Val Ile Asn Cys Gln |      |     |
| 305   | 310  | 315 |
| 320   |      |     |
| cac tcc atg tcc tet gtg ett gga tgg ttc gcc aac ccc atc cac ggg | 1008 |     |
| His Ser Met Ser Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly |      |     |
| 325   | 330  | 335 |
| gac ggc gac tac cct gag ttc atg aag acg ggc gcc atg atc ccc gag | 1056 |     |
| Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Phe Met Lys Thr Gly Ala Met Ile Pro Glu |      | 40  |
| 340   | 345  | 350 |
| ttc tct gag gca gag aag gag gag gtg agg ggc acg gct gat ttc ttt | 1104 |     |
| Phe Ser Glu Ala Glu Lys Glu Glu Val Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe |      |     |
| 355   | 360  | 365 |

|   |      |    |
|---|------|----|
| gcc ttt tcc ttc ggg ccc aac aac ttc agg ccc tca aac acc gtg gtg | 1152 |    |
| Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Arg Pro Ser Asn Thr Val Val |      |    |
| 370 375 380   |      |    |
| aaa atg gga caa aat gta tca ctc aac tta agg cag gtg ctg aac tgg | 1200 |    |
| Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Gln Val Leu Asn Trp |      |    |
| 385 390 395 400   |      |    |
| att aaa ctg gaa tac gat gac cct caa atc ttg att tcg gag aac ggc | 1248 | 10 |
| Ile Lys Leu Glu Tyr Asp Asp Pro Gln Ile Leu Ile Ser Glu Asn Gly |      |    |
| 405 410 415   |      |    |
| tgg ttc aca gat agc tat ata aag aca gag gac acc acg gcc atc tac | 1296 |    |
| Trp Phe Thr Asp Ser Tyr Ile Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr |      |    |
| 420 425 430   |      |    |
| atg atg aag aat ttc cta aac cag gtt ctt caa gca ata aaa ttt gat | 1344 | 20 |
| Met Met Lys Asn Phe Leu Asn Gln Val Leu Gln Ala Ile Lys Phe Asp |      |    |
| 435 440 445   |      |    |
| gaa atc cgc gtg ttt ggt tat acg gcc tgg act ctc ctg gat ggc ttt | 1392 |    |
| Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Thr Leu Leu Asp Gly Phe |      |    |
| 450 455 460   |      |    |
| gag tgg cag gat gcc tat acg acc cga cga ggg ctg ttt tat gtg gac | 1440 |    |
| Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp |      |    |
| 465 470 475 480   |      | 30 |
| ttt aac agt gag cag aaa gag agg aaa ccc aag tcc tcg gct cat tac | 1488 |    |
| Phe Asn Ser Glu Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr |      |    |
| 485 490 495   |      |    |
| tac aag cag atc ata caa gac aac ggc ttc cct ttg aaa gag tcc acg | 1536 |    |
| Tyr Lys Gln Ile Ile Gln Asp Asn Gly Phe Pro Leu Lys Glu Ser Thr |      |    |
| 500 505 510   |      |    |
| cca gac atg aag ggt cgg ttc ccc tgt gat ttc tct tgg gga gtc act | 1584 | 40 |
| Pro Asp Met Lys Gly Arg Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr |      |    |
| 515 520 525   |      |    |
| gag tct gtt ctt aag ccc gag ttt acg gtc tcc tcc ccg cag ttt acc | 1632 |    |

|   |                             |             |      |
|---|-----------------------------|-------------|------|
| Glu Ser Val Leu Lys Pro   | Glu Phe Thr Val Ser Ser Pro | Gln Phe Thr |      |
| 530   | 535                         | 540         |      |
| gat cct cac ctg tat gtg tgg aat gtc act ggc aac aga ttg etc tac |                             |             | 1680 |
| Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Val Thr Gly Asn Arg Leu Leu Tyr |                             |             |      |
| 545   | 550                         | 555         | 560  |
| cga gtg gaa ggg gta agg ctg aaa aca aga cca tcc cag tgc aca gat |                             |             | 1728 |
| Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ser Gln Cys Thr Asp |                             |             |      |
|   | 565                         | 570         | 575  |
| tat gtg agc atc aaa aaa cga gtt gaa atg ttg gca aaa atg aaa gtc |                             |             | 1776 |
| Tyr Val Ser Ile Lys Lys Arg Val Glu Met Leu Ala Lys Met Lys Val |                             |             |      |
|   | 580                         | 585         | 590  |
| acc cac tac cag ttt gct ctg gac tgg acc tct atc ctt ccc act ggc |                             |             | 1824 |
| Thr His Tyr Gln Phe Ala Leu Asp Trp Thr Ser Ile Leu Pro Thr Gly |                             |             |      |
|   | 595                         | 600         | 605  |
| aat ctg tcc aaa gtt aac aga caa gtg tta agg tac tat agg tgt gtg |                             |             | 1872 |
| Asn Leu Ser Lys Val Asn Arg Gln Val Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val |                             |             |      |
|   | 610                         | 615         | 620  |
| gtg agc gaa gga ctg aag ctg ggc gtc ttc ccc atg gtg acg ttg tac |                             |             | 1920 |
| Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Val Phe Pro Met Val Thr Leu Tyr |                             |             |      |
|   | 625                         | 630         | 635  |
| 640   |                             |             |      |
| cac cca acc cac tcc cat etc ggc etc ccc ctg cca ctt ctg agc agt |                             |             | 1968 |
| His Pro Thr His Ser His Leu Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Ser Ser |                             |             |      |
|   | 645                         | 650         | 655  |
| ggg ggg tgg cta aac atg aac aca gcc aag gcc ttc cag gac tac gct |                             |             | 2016 |
| Gly Gly Trp Leu Asn Met Asn Thr Ala Lys Ala Phe Gln Asp Tyr Ala |                             |             |      |
|   | 660                         | 665         | 670  |
| gag ctg tgc ttc cgg gag ttg ggg gac ttg gtg aag etc tgg atc acc |                             |             | 2064 |
| Glu Leu Cys Phe Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr |                             |             |      |
|   | 675                         | 680         | 685  |
| atc aat gag cct aac agg ctg agt gac atg tac aac cgc acg agt aat |                             |             | 2112 |
| Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Met Tyr Asn Arg Thr Ser Asn |                             |             |      |
|   | 690                         | 695         | 700  |

|   |      |             |
|---|------|-------------|
| gac acc tac cgt gca gcc cac aac ctg atg atc gcc cat gcc cag gtc | 2160 |             |
| Asp Thr Tyr Arg Ala Ala His Asn Leu Met Ile Ala His Ala Gln Val |      |             |
| 705   | 710  | 715 720     |
| tgg cac ctc tat gat agg cag tat agg ccg gtc cag cat ggg gct gtg | 2208 |             |
| Trp His Leu Tyr Asp Arg Gln Tyr Arg Pro Val Gln His Gly Ala Val |      |             |
|   | 725  | 730 735     |
| tcg ctg tcc tta cat tgc gac tgg gca gaa cct gcc aac ccc ttt gtg | 2256 | 10          |
| Ser Leu Ser Leu His Cys Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Phe Val |      |             |
|   | 740  | 745 750     |
| gat tca cac tgg aag gca gcc gag cgc ttc ctc cag ttt gag atc gcc | 2304 |             |
| Asp Ser His Trp Lys Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala |      |             |
|   | 755  | 760 765     |
| tgg ttt gca gat ccg ctc ttc aag act ggc gac tat cca tcg gtt atg | 2352 |             |
| Trp Phe Ala Asp Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ser Val Met |      | 20          |
|   | 770  | 775 780     |
| aag gaa tac atc gcc tcc aag aac cag cga ggg ctg tct agc tca gtc | 2400 |             |
| Lys Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Asn Gln Arg Gly Leu Ser Ser Ser Val |      |             |
|   | 785  | 790 795 800 |
| ctg ccg cgc ttc acc gcg aag gag agc agg ctg gtg aag ggt acc gtc | 2448 |             |
| Leu Pro Arg Phe Thr Ala Lys Glu Ser Arg Leu Val Lys Gly Thr Val |      |             |
|   | 805  | 810 815     |
|   |      | 30          |
| gac ttc tac gca ctg aac cac ttc act acg agg ttc gtg ata cac aag | 2496 |             |
| Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Ile His Lys |      |             |
|   | 820  | 825 830     |
| cag ctg aac acc aac cgc tca gtt gca gac agg gac gtc cag ttc ctg | 2544 |             |
| Gln Leu Asn Thr Asn Arg Ser Val Ala Asp Arg Asp Val Gln Phe Leu |      |             |
|   | 835  | 840 845     |
| cag gac atc acc cgc cta agc tcg ccc agc cgc ctg gct gta aca ccc | 2592 | 40          |
| Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro |      |             |
|   | 850  | 855 860     |
| tgg gga gtg cgc aag ctc ctt gcg tgg atc cgg agg aac tac aga gac | 2640 |             |

|   |      |                |
|---|------|----------------|
| Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp |      |                |
| 865   | 870  | 875 880        |
| agg gat atc tac atc aca gcc aat ggc atc gat gac ctg gct cta gag |      | 2688           |
| Arg Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Leu Ala Leu Glu | 885  | 890 895        |
| gat gat cag atc cga aag tac tac ttg gag aag tat gtc cag gag gct |      | 2736           |
| Asp Asp Gln Ile Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Val Gln Glu Ala | 900  | 905 910        |
| ctg aaa gca tat ctc att gac aag gtc aaa atc aaa ggc tac tat gca |      | 2784           |
| Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala | 915  | 920 925        |
| ttc aaa ctg act gaa gag aaa tct aag cct aga ttt gga ttt ttc acc |      | 2832           |
| Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr | 930  | 935 940        |
| tet gac ttc aga gct aag tcc tet gtc cag ttt tac agc aag ctg atc |      | 2880           |
| Ser Asp Phe Arg Ala Lys Ser Ser Val Gln Phe Tyr Ser Lys Leu Ile | 945  | 950 955 960    |
| agc agc agt ggc ctc ccc gct gag aac aga agt cct gcg tgt ggt cag |      | 2928           |
| Ser Ser Ser Gly Leu Pro Ala Glu Asn Arg Ser Pro Ala Cys Gly Gln | 965  | 970 975        |
| cct gcg gaa gac aca gac tgc acc att tgc tca ttt ctc gtg gag aag |      | 2976           |
| Pro Ala Glu Asp Thr Asp Cys Thr Ile Cys Ser Phe Leu Val Glu Lys | 980  | 985 990        |
| aaa cca ctc atc ttc ttc ggt tgc tgc ttc atc tcc act ctg gct gta |      | 3024           |
| Lys Pro Leu Ile Phe Phe Gly Cys Cys Phe Ile Ser Thr Leu Ala Val | 995  | 1000 1005      |
| ctg cta tcc atc acc gtt ttt cat cat caa aag aga aga aaa ttc cag |      | 3072           |
| Leu Leu Ser Ile Thr Val Phe His His Gln Lys Arg Arg Lys Phe Gln | 1010 | 1015 1020      |
| aaa gca agg aac tta caa aat ata cca ttg aag aaa ggc cac agc aga |      | 3120           |
| Lys Ala Arg Asn Leu Gln Asn Ile Pro Leu Lys Lys Gly His Ser Arg | 1025 | 1030 1035 1040 |

gtt ttc agc  
Val Phe Ser

3129

<210> 5  
<211> 3042  
<212> DNA  
<213> Mouse

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(3042)

10

<400> 5

atg tcc aac agg gca ctg caa aga tct gcc gtg ctg tct gcg ttt gtt 48  
Met Ser Asn Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val  
1 5 10 15

ctg ctg cga gct gtt acc ggc ttc tcc gga gac ggg aaa gca ata tgg 96  
Leu Leu Arg Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp  
20 25 30

20

gat aaa aaa cag tac gtg agt ccg gta aac cca agt cag ctg ttc etc 144  
Asp Lys Lys Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu  
35 40 45

tat gac act ttc cct aaa aac ttt tcc tgg ggc gtt ggg acc gga gca 192  
Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala  
50 55 60

30

ttt caa gtg gaa ggg agt tgg aag aca gat gga aga gga ccc tcg atc 240  
Phe Gln Val Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile  
65 70 75 80

tgg gat cgg tac gtc tac tca cac ctg aga ggt gtc aac ggc aca gac 288  
Trp Asp Arg Tyr Val Tyr Ser His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp  
85 90 95

40

aga tcc act gac agt tac atc ttt ctg gaa aaa gac ttg ttg gct ctg 336  
Arg Ser Thr Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu  
100 105 110

|   |     |    |
|---|-----|----|
| gat ttt tta gga gtt tct ttt tat cag ttc tca atc tcc tgg cca cgg | 384 |    |
| Asp Phe Leu Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg |     |    |
| 115 120 125   |     |    |
| ttg ttt ccc aat gga aca gta gca gca gtg aat gcg caa ggt ctc cgg | 432 |    |
| Leu Phe Pro Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg |     |    |
| 130 135 140   |     |    |
| tac tac cgt gca ctt ctg gac tgc ctg gta ctt agg aat atc gag ccc | 480 | 10 |
| Tyr Tyr Arg Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro |     |    |
| 145 150 155 160   |     |    |
| att gtt acc ttg tac cat tgg gat ttg cct ctg acg ctc cag gaa gaa | 528 |    |
| Ile Val Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu |     |    |
| 165 170 175   |     |    |
| tat ggg ggc tgg aaa aat gca act atg ata gat ctc ttc aac gac tat | 576 |    |
| Tyr Gly Gly Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr |     | 20 |
| 180 185 190   |     |    |
| gcc aca tac tgc ttc cag acc ttt gga gac cgt gtc aaa tat tgg att | 624 |    |
| Ala Thr Tyr Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile |     |    |
| 195 200 205   |     |    |
| aca att cac aac cct tac ctt gtt gct tgg cat ggg ttt ggc aca ggt | 672 |    |
| Thr Ile His Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly |     |    |
| 210 215 220   |     | 30 |
| atg cat gca cca gga gag aag gga aat tta aca gct gtc tac act gtg | 720 |    |
| Met His Ala Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val |     |    |
| 225 230 235 240   |     |    |
| gga cac aac ctg atc aag gca cat tgc aaa gtg tgg cat aac tac gac | 768 |    |
| Gly His Asn Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asp |     |    |
| 245 250 255   |     |    |
| aaa aac ttc cgc cct cat cag aag ggt tgg ctc tcc atc acc ttg ggg | 816 | 40 |
| Lys Asn Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly |     |    |
| 260 265 270   |     |    |
| tcc cat tgg ata gag cca aac aga aca gac aac atg gag gac gtg atc | 864 |    |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|----|
| tat | gtg | gac | ttt | aac | agt | gag | cag | aaa | gag | agg | aaa | ccc | aag | tcc | teg | 1392 |    |
| Tyr | Val | Asp | Phe | Asn | Ser | Glu | Gln | Lys | Glu | Arg | Lys | Pro | Lys | Ser | Ser |      |    |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |     |     |     |      |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| gct | cat | tac | tac | aag | cag | atc | ata | caa | gac | aac | ggc | ttc | cct | ttg | aaa | 1440 |    |
| Ala | His | Tyr | Tyr | Lys | Gln | Ile | Ile | Gln | Asp | Asn | Gly | Phe | Pro | Leu | Lys |      |    |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     | 475 |     |     |     |     |     | 480 |      |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| gag | tcc | acg | cca | gac | atg | aag | ggt | egg | ttc | ccc | tgt | gat | ttc | tct | tgg | 1488 | 10 |
| Glu | Ser | Thr | Pro | Asp | Met | Lys | Gly | Arg | Phe | Pro | Cys | Asp | Phe | Ser | Trp |      |    |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     | 495 |     |      |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| gga | gtc | act | gag | tct | gtt | ctt | aag | ccc | gag | ttt | acg | gtc | tcc | tcc | ccg | 1536 |    |
| Gly | Val | Thr | Glu | Ser | Val | Leu | Lys | Pro | Glu | Phe | Thr | Val | Ser | Ser | Pro |      |    |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |      |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| cag | ttt | acc | gat | cct | cac | ctg | tat | gtg | tgg | aat | gtc | act | ggc | aac | aga | 1584 |    |
| Gln | Phe | Thr | Asp | Pro | His | Leu | Tyr | Val | Trp | Asn | Val | Thr | Gly | Asn | Arg |      | 20 |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |      |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| ttg | ctc | tac | cga | gtg | gaa | ggg | gta | agg | ctg | aaa | aca | aga | cca | tcc | cag | 1632 |    |
| Leu | Leu | Tyr | Arg | Val | Glu | Gly | Val | Arg | Leu | Lys | Thr | Arg | Pro | Ser | Gln |      |    |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |      |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| tgc | aca | gat | tat | gtg | agc | atc | aaa | aaa | cga | gtt | gaa | atg | ttg | gca | aaa | 1680 |    |
| Cys | Thr | Asp | Tyr | Val | Ser | Ile | Lys | Lys | Arg | Val | Glu | Met | Leu | Ala | Lys |      |    |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |     |      | 30 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| atg | aaa | gtc | acc | cac | tac | cag | ttt | gct | ctg | gac | tgg | acc | tct | atc | ctt | 1728 |    |
| Met | Lys | Val | Thr | His | Tyr | Gln | Phe | Ala | Leu | Asp | Trp | Thr | Ser | Ile | Leu |      |    |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     | 570 |     |     |     |     |     | 575 |     |      |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| ccc | act | ggc | aat | ctg | tcc | aaa | gtt | aac | aga | caa | gtg | tta | agg | tac | tat | 1776 |    |
| Pro | Thr | Gly | Asn | Leu | Ser | Lys | Val | Asn | Arg | Gln | Val | Leu | Arg | Tyr | Tyr |      |    |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |      |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| agg | tgt | gtg | gtg | agc | gaa | gga | ctg | aag | ctg | ggc | gtc | ttc | ccc | atg | gtg | 1824 | 40 |
| Arg | Cys | Val | Val | Ser | Glu | Gly | Leu | Lys | Leu | Gly | Val | Phe | Pro | Met | Val |      |    |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |      |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| acg | ttg | tac | cac | cca | acc | cac | tcc | cat | ctc | ggc | ctc | ccc | ctg | cca | ctt | 1872 |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|----|
| Thr | Leu | Tyr | His | Pro | Thr | His | Ser | His | Leu | Gly | Leu | Pro | Leu | Pro | Leu |      |    |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |      |    |
| ctg | agc | agt | ggg | ggg | tgg | cta | aac | atg | aac | aca | gcc | aag | gcc | ttc | cag | 1920 |    |
| Leu | Ser | Ser | Gly | Gly | Trp | Leu | Asn | Met | Asn | Thr | Ala | Lys | Ala | Phe | Gln |      |    |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |      |    |
| gac | tac | gct | gag | ctg | tgc | ttc | cgg | gag | ttg | ggg | gac | ttg | gtg | aag | ctc | 1968 |    |
| Asp | Tyr | Ala | Glu | Leu | Cys | Phe | Arg | Glu | Leu | Gly | Asp | Leu | Val | Lys | Leu |      | 10 |
|     |     |     | 645 |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |      |    |
| tgg | atc | acc | atc | aat | gag | cct | aac | agg | ctg | agt | gac | atg | tac | aac | cgc | 2016 |    |
| Trp | Ile | Thr | Ile | Asn | Glu | Pro | Asn | Arg | Leu | Ser | Asp | Met | Tyr | Asn | Arg |      |    |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     |     | 670 |     |      |    |
| acg | agt | aat | gac | acc | tac | cgt | gca | gcc | cac | aac | ctg | atg | atc | gcc | cat | 2064 |    |
| Thr | Ser | Asn | Asp | Thr | Tyr | Arg | Ala | Ala | His | Asn | Leu | Met | Ile | Ala | His |      | 20 |
|     |     | 675 |     |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     | 685 |     |      |    |
| gcc | cag | gtc | tgg | cac | ctc | tat | gat | agg | cag | tat | agg | ccg | gtc | cag | cat | 2112 |    |
| Ala | Gln | Val | Trp | His | Leu | Tyr | Asp | Arg | Gln | Tyr | Arg | Pro | Val | Gln | His |      |    |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |      |    |
| ggg | gct | gtg | tcg | ctg | tcc | tta | cat | tgc | gac | tgg | gca | gaa | cct | gcc | aac | 2160 |    |
| Gly | Ala | Val | Ser | Leu | Ser | Leu | His | Cys | Asp | Trp | Ala | Glu | Pro | Ala | Asn |      |    |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |      |    |
| ccc | ttt | gtg | gat | tca | cac | tgg | aag | gca | gcc | gag | cgc | ttc | ctc | cag | ttt | 2208 | 30 |
| Pro | Phe | Val | Asp | Ser | His | Trp | Lys | Ala | Ala | Glu | Arg | Phe | Leu | Gln | Phe |      |    |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |      |    |
| gag | atc | gcc | tgg | ttt | gca | gat | cgg | ctc | tte | aag | act | ggc | gac | tat | cca | 2256 |    |
| Glu | Ile | Ala | Trp | Phe | Ala | Asp | Pro | Leu | Phe | Lys | Thr | Gly | Asp | Tyr | Pro |      |    |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     |     | 750 |      |    |
| tcg | gtt | atg | aag | gaa | tac | atc | gcc | tcc | aag | aac | cag | cga | ggg | ctg | tct | 2304 |    |
| Ser | Val | Met | Lys | Glu | Tyr | Ile | Ala | Ser | Lys | Asn | Gln | Arg | Gly | Leu | Ser |      | 40 |
|     |     | 755 |     |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     |     |     | 765 |      |    |
| agc | tea | gtc | ctg | ccg | cgc | ttc | acc | gcg | aag | gag | agc | agg | ctg | gtg | aag | 2352 |    |
| Ser | Ser | Val | Leu | Pro | Arg | Phe | Thr | Ala | Lys | Glu | Ser | Arg | Leu | Val | Lys |      |    |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     |     |     |     |     | 780 |      |    |

|   |      |     |
|---|------|-----|
| ggt acc gtc gac ttc tac gca ctg aac cac ttc act acg agg ttc gtg | 2400 |     |
| Gly Thr Val Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val |      |     |
| 785   | 790  | 795 |
| 800   |      |     |
| ata cac aag cag ctg aac acc aac cgc tca gtt gca gac agg gac gtc | 2448 |     |
| Ile His Lys Gln Leu Asn Thr Asn Arg Ser Val Ala Asp Arg Asp Val |      |     |
| 805   | 810  | 815 |
| cag ttc ctg cag gac atc acc cgc cta agc tgc ccc agc cgc ctg gct | 2496 | 10  |
| Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala |      |     |
| 820   | 825  | 830 |
| gta aca ccc tgg gga gtg cgc aag ctc ctt gcg tgg atc cgg agg aac | 2544 |     |
| Val Thr Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn |      |     |
| 835   | 840  | 845 |
| tac aga gac agg gat atc tac atc aca gcc aat ggc atc gat gac ctg | 2592 |     |
| Tyr Arg Asp Arg Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Leu |      | 20  |
| 850   | 855  | 860 |
| gct cta gag gat gat cag atc cga aag tac tac ttg gag aag tat gtc | 2640 |     |
| Ala Leu Glu Asp Asp Gln Ile Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Val |      |     |
| 865   | 870  | 875 |
| 880   |      |     |
| cag gag gct ctg aaa gca tat ctc att gac aag gtc aaa atc aaa ggc | 2688 |     |
| Gln Glu Ala Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly |      |     |
| 885   | 890  | 895 |
| 900   |      | 30  |
| tac tat gca ttc aaa ctg act gaa gag aaa tct aag cct aga ttt gga | 2736 |     |
| Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly |      |     |
| 900   | 905  | 910 |
| ttt ttc acc tct gac ttc aga gct aag tcc tct gtc cag ttt tac agc | 2784 |     |
| Phe Phe Thr Ser Asp Phe Arg Ala Lys Ser Ser Val Gln Phe Tyr Ser |      |     |
| 915   | 920  | 925 |
| aag ctg atc agc agc agt ggc ctc ccc gct gag aac aga agt cct gcg | 2832 | 40  |
| Lys Leu Ile Ser Ser Ser Gly Leu Pro Ala Glu Asn Arg Ser Pro Ala |      |     |
| 930   | 935  | 940 |
| tgt ggt cag cct gcg gaa gac aca gac tgc acc att tgc tca ttt ctc | 2880 |     |

Cys Gly Gln Pro Ala Glu Asp Thr Asp Cys Thr Ile Cys Ser Phe Leu  
 945 950 955 960

gtg gag aag aaa cca ctc atc ttc ttc ggt tgc tgc ttc atc tcc act 2928  
 Val Glu Lys Lys Pro Leu Ile Phe Phe Gly Cys Cys Phe Ile Ser Thr  
 965 970 975

ctg gct gta ctg cta tcc atc acc gtt ttt cat cat caa aag aga aga 2976  
 Leu Ala Val Leu Leu Ser Ile Thr Val Phe His His Gln Lys Arg Arg 10  
 980 985 990

aaa ttc cag aaa gca agg aac tta caa aat ata cca ttg aag aaa ggc 3024  
 Lys Phe Gln Lys Ala Arg Asn Leu Gln Asn Ile Pro Leu Lys Lys Gly  
 995 1000 1005

cac agc aga gtt ttc agc 3042  
 His Ser Arg Val Phe Ser  
 1010

<210> 6  
 <211> 885  
 <212> DNA  
 <213> Mouse

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(885) 30

<400> 6  
 atg aag aca ggc tgt gca gca ggg tct ccg ggg aat gaa tgg att ttc 48  
 Met Lys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe  
 1 5 10 15

ttc agc tct gat gaa aga aac aca cgc tct agg aaa aca atg tcc aac 96  
 Phe Ser Ser Asp Glu Arg Asn Thr Arg Ser Arg Lys Thr Met Ser Asn  
 20 25 30 40

agg gca ctg caa aga tct gcc gtg ctg tct gcg ttt gtt ctg ctg cga 144  
 Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val Leu Leu Arg  
 35 40 45

|   |     |    |
|---|-----|----|
| gct gtt acc ggc ttc tcc gga gac ggg aaa gca ata tgg gat aaa aaa | 192 |    |
| Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp Asp Lys Lys |     |    |
| 50 55 60  |     |    |
| <br>  |     |    |
| cag tac gtg agt ccg gta aac cca agt cag ctg ttc ctc tat gac act | 240 |    |
| Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr |     |    |
| 65 70 75 80   |     |    |
| <br>  |     |    |
| ttc cct aaa aac ttt tcc tgg ggc gtt ggg acc gga gca ttt caa gtg | 288 | 10 |
| Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala Phe Gln Val |     |    |
| 85 90 95  |     |    |
| <br>  |     |    |
| gaa ggg agt tgg aag aca gat gga aga gga ccc tcg atc tgg gat cgg | 336 |    |
| Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp Arg |     |    |
| 100 105 110   |     |    |
| <br>  |     |    |
| tac gtc tac tca cac ctg aga ggt gtc aac ggc aca gac aga tcc act | 384 |    |
| Tyr Val Tyr Ser His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp Arg Ser Thr |     | 20 |
| 115 120 125   |     |    |
| <br>  |     |    |
| gac agt tac atc ttt ctg gaa aaa gac ttg ttg gct ctg gat ttt tta | 432 |    |
| Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Phe Leu |     |    |
| 130 135 140   |     |    |
| <br>  |     |    |
| gga gtt tet ttt tat cag ttc tca atc tcc tgg cca cgg ttg ttt ccc | 480 |    |
| Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro |     |    |
| 145 150 155 160   |     | 30 |
| <br>  |     |    |
| aat gga aca gta gca gca gtg aat gcg caa ggt ctc cgg tac tac cgt | 528 |    |
| Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg |     |    |
| 165 170 175   |     |    |
| <br>  |     |    |
| gca ctt ctg gac tcg ctg gta ctt agg aat atc gag ccc att gtt acc | 576 |    |
| Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr |     |    |
| 180 185 190   |     |    |
| <br>  |     |    |
| ttg tac cat tgg gat ttg cct ctg acg ctc cag gaa gaa tat ggg ggc | 624 | 40 |
| Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly |     |    |
| 195 200 205   |     |    |
| <br>  |     |    |
| tgg aaa aat gca act atg ata gat ctc ttc aac gac tat gcc aca tac | 672 |    |
| Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr |     |    |

| 210   | 215 | 220 |     |    |
|---|-----|-----|-----|----|
| tgc ttc cag acc ttt gga gac cgt gtc aaa tat tgg att aca att cac |     |     | 720 |    |
| Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His |     |     |     |    |
| 225   | 230 | 235 | 240 |    |
|   |     |     |     |    |
| aac cct tac ctt gtt gct tgg cat ggg ttt ggc aca ggt atg cat gca |     |     | 768 |    |
| Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala |     |     |     |    |
|   | 245 | 250 | 255 | 10 |
|   |     |     |     |    |
| cca gga gag aag gga aat tta aca gct gtc tac act gtg gga cac aac |     |     | 816 |    |
| Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn |     |     |     |    |
|   | 260 | 265 | 270 |    |
|   |     |     |     |    |
| ctg atc aag gta ctg tac agc tgg ctt ctc aca aga gct tca gaa ttg |     |     | 864 |    |
| Leu Ile Lys Val Leu Tyr Ser Trp Leu Leu Thr Arg Ala Ser Glu Leu |     |     |     |    |
|   | 275 | 280 | 285 |    |
|   |     |     |     |    |
| ggg ggg ggt gtt ctt ggg ggt                                     |     |     | 885 | 20 |
| Gly Gly Gly Val Leu Gly Gly                                     |     |     |     |    |
|   | 290 | 295 |     |    |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 4048

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

30

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; exon

&lt;222&gt; (2178)..(3002)

&lt;400&gt; 7

gagctcccag agatctgtct gcttctgcct ccagccctgg aattaaaggt gtgcaccgcc 60

gcagcaagca ggccccacgt ttagttttct ctttttacct ttttacggga aattcaaact 120

40

caagacctca ggctgcata ggaaatgett ttaccacctt accatgtgcc caacccaat 180

agaaccttcc caatgcaaaa ttttaagtgt ttattgctgg tgtgcaagaa agcaattaac 240

tgctttttct atattatctt gcattttata tctagttgt ttgtttgaac ceggtttttc 300

agttgattaa ttttgggatt tttttttca taaacaatca tgatcaccta tgagettaca 360  
 gttttatttg ttgettecta gtgtgtgtgt tttgtttcet tttettggat tacctagaga 420  
 ttctactgcg gtactggatc aagtgaagaa gataaagtat taaggaagcc caaagatcag 480  
 tcagcaggaa ttcacacaca cgcacacaca cacacacaca cacacactaa cacacacatc 540  
 agtgagagtc cacatctttg cctcctcctg ctttggtagg aaaacateta gtttctcatt 600 10  
 aagaaacttt tctttcactg agatacacac atatacattt tgtttaatct ttaaggggat 660  
 ttttttagat ttgtttactt attttatgtg agtgcactcg tttgcccata tatatatgac 720  
 gcgtatgcct ggagcctttg gaggtcagaa aagggcatca gattcctca actagaatta 780  
 cggctggttg tgggetgcca tgtgagtget gggaatcaaa ctcaagacct ctgcaagagc 840  
 aacaagtget cttaactgat gaactacttt ccagcctctg taaatacagt tgtttttta 900 20  
 ttaaatacac acacacacac acacacacac acatatatat acagagagag agagaggctg 960  
 gagagatggc tcagcggttt agaacactga ctgctcttcc aaaggtccag agttcaaate 1020  
 ccagcaacca catggtggct cacaaccate tgtaatggga tetgatgccc tettegggag 1080  
 tgtetgaaga caactacagt gaacttacat ataataaacg aataaataaa tttttttaa 1140 30  
 aaaagaaaaa aaagtttaag taccctgctg ggcctggcga tgcaggcctg aggcagggga 1200  
 attgccataa ctteggagcc ageltgtact acatatcaag tteatgggta gcgtattgca 1260  
 ccctgcttt aaaataaaag taaatagaaa actggagatg ttgcccagtg gtagagcttt 1320  
 ttetttagcat cegaaagacc taggtttgat ctctagttct gccaaaagaa attaaattca 1380  
 tagacecccc aacaagtect caaactcaaa ttgtettcca tatccagtgc catgtaacce 1440 40  
 caggetgact tcagattecc ggtgtageca agtacaactg tgaacttctg tcectttgga 1500  
 tttaectec aaagtgetcc aatecaaaag ctctggcta cttgatttga tttgggggtc 1560





aca ggt atg cat gca cca gga gag aag gga aat tta aca get gtc tac 2978  
 Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr  
                   255                                  260                                  265

act gtg gga cac aac ctg atc aag gtactgtaca gctggcttct cacaagagct 3032  
 Thr Val Gly His Asn Leu Ile Lys  
                   270                                  275

tcagaattgg ggggggggtgt tcttgggggt taaaggaaac attcttttaa ggaacagttt 3092

10

gccaaaaatc aacaccacta agttcacgct aacttacaaa ttctgtcctc caattttata 3152

tttaaagttg gctgtgtctc atcttccacg atcagtaacta atatattgat ttatttggtt 3212

tccttcacag ctgccctttg aggtcatttt taaagtaaac agttatgtag ttagatgtga 3272

gaacgggagt ccagttttag tctgtgggaa agcaacgctt tasagagatt gtgtttttcc 3332

gacaatccct cccgatgga gaataacgtg actacacaat cgttctaata cgggtttggt 3392

20

gctcctgtgc ttggtggcac ttagctgtgg taagggaat cgcggtagc tcacctatgc 3452

ttattaaata cagaaaatga aatgatttac agctcacagt tggcactaca tgggtcccct 3512

agcaaacag gtgggatagc atgtgttggg agctaaatga aaccaacct aaaacgtgag 3572

aagaatagge cctacttggg ggagaggtat ttaagatggg gtatctcaga agccagagtt 3632

tgtgetggga aaagetccat gtattaaaac aataatgaaa gtgcataaaa aatagcagtt 3692

cctactgtgt gcgcacagtg tcagtttgac cctcgtaaca gccatgaaat aggccttctg 3752

tctcattatt ctcttctca ggtgggactt tcagggaat caaattcagc catgttcaaa 3812

atcaaattca gctgetgtgt gtatgatatt tatgattgce agtgttatca aaagetcttt 3872

attttaaate ttttctatta aagggtaatc tagggacttt ggtgggacaa agcctcacag 3932

gagactgaca tctggagaca gagttaaact cttggataaa tagttcactt gagaaaaata 3992

aaggacttga aatacttgtt acattggtta agatgaaaag gaaagttat cagcat 4048

40

<210> 8  
 <211> 303  
 <212> DNA  
 <213> Mouse

<400> 8  
 aaggatgga aaggacctt tatatgggat cgtacgtct actcacact taaaggtgtc 60  
 aacggcacag acagatccac tgacagttac atctttcttg aaaaaaactt gttgctctg 120  
 gatttttag gagtttcttt ttatcagttc tcaatctct ggccacggtt gtttcccaat 180  
 ggaaaagtag cagcartgaa tgcgcaaggt ctccggtact accgtgcact tctggactcg 240  
 ctggtactta ggaatatga rccattggtt accttgtacc attgggattt gctttggcac 300  
 tac 303

10

20

<210> 9  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Synthtic DNA

<400> 9  
 gaaggatgga aaaggacctt ctatatgg 28

30

<210> 10  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Synthtic DNA

40

<400> 10

|   |    |    |
|---|----|----|
| tgtagtgcca aaggcaaate cca                             | 23 |    |
| <210> 11  |    |    |
| <211> 28  |    |    |
| <212> DNA   |    |    |
| <213> Artificial Sequence                             |    |    |
| <220>   |    | 10 |
| <223> Description of Artificial Sequence:Synthtic DNA |    |    |
| <400> 11  |    |    |
| cggtagctct actcacacct taaaggtg                        | 28 |    |
| <210> 12  |    |    |
| <211> 22  |    |    |
| <212> DNA   |    | 20 |
| <213> Artificial Sequence                             |    |    |
| <220>   |    |    |
| <223> Description of Artificial Sequence:Synthtic DNA |    |    |
| <400> 12  |    |    |
| gtaccggaga ccttgccat tc                               | 22 |    |
| <210> 13  |    | 30 |
| <211> 22  |    |    |
| <212> DNA   |    |    |
| <213> Artificial Sequence                             |    |    |
| <220>   |    |    |
| <223> Description of Artificial Sequence:Synthtic DNA |    |    |
| <400> 13  |    |    |
| acccaagtca gctgttctc tat                              | 22 | 40 |
| <210> 14  |    |    |
| <211> 25  |    |    |
| <212> DNA   |    |    |

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthtic DNA

<400> 14

gacagctggt aaatttcct tctct

25

10

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthtic DNA

<400> 15

gaccagctc tggaggatga cc

22

20

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthtic DNA

30

<400> 16

atcctcatag cttactgtca ggatg

25

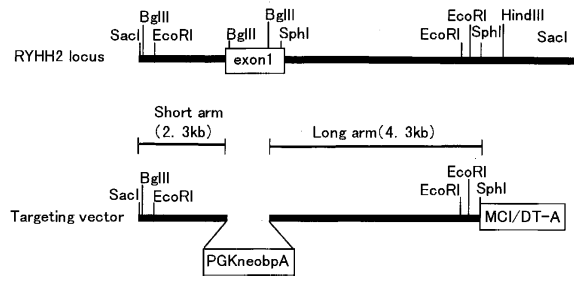
【図面の簡単な説明】

第1図は、老化抑制遺伝子染色体遺伝子クローンの制限酵素地図、および相同組換え法による本老化抑制遺伝子欠失、置換体作成用 *targeting vector* の構造を示す図である。図中、bpは塩基対 (base pairs)、kbはキロ塩基対 (kilobase pairs)、PGKneobpAはPGKプロター - ネオマイシン耐性遺伝子 - ウシ成長ホルモン遺伝子ポリアデニレーションシグナル配列からなるネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットMC1/DT-A : MC1プロモータとジフテリア毒素A鎖からなるジフテリア毒素A鎖発現ユニットを表す。

40

【 図 1 】

第1図



## フロントページの続き

|                                |  |               |   |
|--------------------------------|--|---------------|---|
| (51) Int.Cl.                   |  | F I           |   |
| <b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b> |  | C 1 2 P 21/02 | C |
| <b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>  |  | C 1 2 Q 1/02  |   |
| <b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>  |  | C 1 2 Q 1/68  | A |
| <b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b> |  | G 0 1 N 33/53 | D |

- (72)発明者 白石 紀彦  
東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 関根 進  
東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 鍋島 陽一  
京都府京都市上京区丸太町通堀川西入西丸太町 1 7 3 - 9 0 1
- (72)発明者 藤森 俊彦  
京都府京都市向日市上植野町車返 8 - 1 0 - 2 - 2 0 4
- (72)発明者 伊藤 慎二  
京都府京都市伏見区京町 3 丁目 1 9 0 - 1 - 2 0 9

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 2 9 5 4 4 ( W O , A 1 )  
MAKOTO KURO , NATURE , 1 9 9 7 年 , V390 N665 , P45-51

## (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/12  
C07K 14/47  
C07K 16/18  
C12Q 1/68  
A01K 67/027  
G01N 33/53  
A61K 38/17  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
BIOSIS/WPI(DIALOG)

|               |   |         |            |
|---------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)       | 新型多肽，新型DNA，新型抗体和新型转基因动物   |         |            |
| 公开(公告)号       | <a href="#">JP4651893B2</a>   | 公开(公告)日 | 2011-03-16 |
| 申请号           | JP2001539872  | 申请日     | 2000-11-17 |
| 申请(专利权)人(译)   | 协和醱酵工业株式会社  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译) | 社团法人芝兰会   |         |            |
| [标]发明人        | 白石紀彦<br>関根進<br>鍋島陽一<br>藤森俊彦<br>伊藤慎二   |         |            |
| 发明人           | 白石 紀彦<br>関根 進<br>鍋島 陽一<br>藤森 俊彦<br>伊藤 慎二  |         |            |
| IPC分类号        | C12N15/09 A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 A61K38/00 A61P43/00 C12N15/12 |         |            |
| CPC分类号        | C07K14/47 A61K38/00   |         |            |
| FI分类号         | C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D                   |         |            |
| 优先权           | 1999329649 1999-11-19 JP  |         |            |
| 其他公开文献        | JPWO2001038529A1  |         |            |
| 外部链接          | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供了具有抑制动物衰老的活性的多肽，编码该多肽的DNA，使用该多肽或编码该多肽的DNA来预防和治疗与衰老相关的疾病的方法，与多肽相互作用的药物，使用多肽或DNA搜索药物的方法以及评估药物必不可少的模型动物的DNA缺失或部分修饰 提供非人类的动物。