

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007 年 10 月 25 日 (25.10.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/119787 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/00 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 9/99* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) *C12P 13/04* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目 1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 座間 猛 (ZAMA, Takeru) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 村田 満 (MURATA, Mitsuru) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 池田 康夫 (IKEDA, Yasuo) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/058079

(22) 国際出願日: 2007 年 4 月 12 日 (12.04.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2006-112524 2006 年 4 月 14 日 (14.04.2006) JP

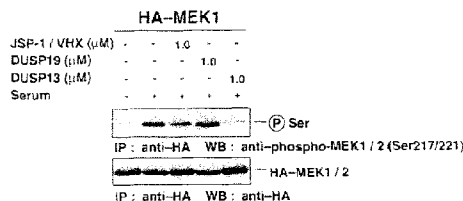
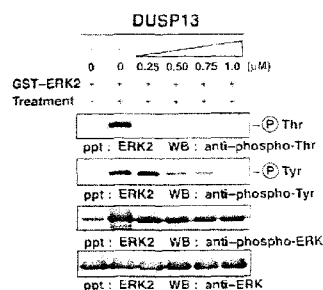
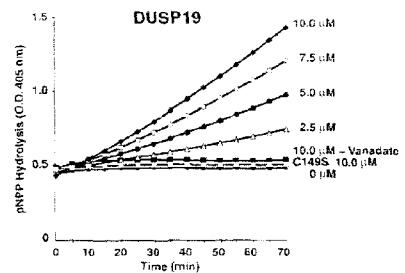
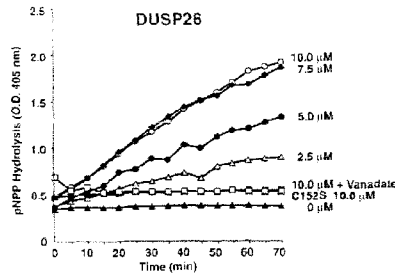
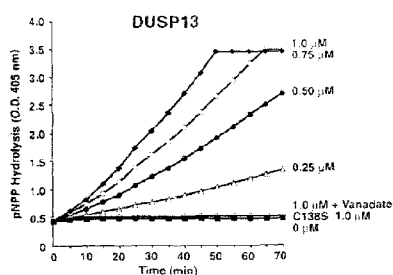
(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

[続葉有]

(54) Title: PHOSPHATASE INVOLVED IN THE REGULATION OF CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION

(54) 発明の名称: 心筋細胞の分化制御を司る脱リン酸化酵素



(57) Abstract: Disclosed are: a phosphatase involved in the regulation of the differentiation of a cardiomyocyte; a dominant inhibitory enzyme for the phosphatase; a gene encoding each of the enzyme proteins; and use of the gene. A protein comprising an amino acid sequence selected from the following sequences (A) to (C) or the like is used: (A) the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2; (B) an amino acid sequence having the deletion, substitution or addition of one or several amino acid residues except a cysteine residue at the 138th position in the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2, which is characterized in that a protein having the amino acid sequence has a dual-specific phosphatase activity; and (C) an amino acid sequence having at least 60% homology to the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2 and having a cysteine residue at the 138th position in the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2, which is characterized in that a protein having the amino acid sequence has a dual-specific phosphatase activity.

[続葉有]

WO 2007/119787 A1



DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,

IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 心筋細胞の分化制御を司る脱リン酸化酵素ならびにその優性阻害酵素、さらにはこれらの酵素タンパク質をコードする遺伝子とそれらの利用法を提供することを課題とするものである。以下の(A)～(C)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質等を用いる。(A)配列番号2に示されるアミノ酸配列;(B)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;(C)配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;

明 細 書

心筋細胞の分化制御を司る脱リン酸化酵素

技術分野

[0001] 本発明は、心筋細胞の分化制御を司る脱リン酸化酵素及びその優性阻害酵素に関する。

背景技術

[0002] リン酸化シグナルは、真核生物に保存され多彩な生理過程に重要な役割を果たす。このうち、チロシン残基のリン酸化異常が、多くの遺伝的ならびに後天的疾患の発症に重要な役割を担っていることが知られており、現在多くのチロシンリン酸化酵素の阻害剤が臨床応用されている。

[0003] 一方、脱リン酸化酵素は、リン酸化シグナル経路における、ある特定部位での脱リン酸化によりその経路を不活化する。脱リン酸化酵素のうち、チロシン脱リン酸化酵素は、様々な生理過程の調節に特異的、主体的にその機能を果たしていることが現在明らかになりつつある(非特許文献1～3参照)。例えば、自己免疫疾患、糖尿病、遺伝性疾患、及び筋疾患の原因遺伝子として同定されたチロシン脱リン酸化酵素は、これまでに14種ある。また癌発症との関連が指摘されるチロシン脱リン酸化酵素についても少なくとも30種が知られている(非特許文献4参照)。しかしながら、それらの生理的役割ならびに標的経路が明らかとされていない現在において、臨床応用可能なチロシン脱リン酸化酵素の阻害剤の開発は未だ未発達な状況にある(非特許文献5参照)。

[0004] 本発明者らは、これまでに、チロシン脱リン酸化酵素の一種であるdual specificity phosphatases (DSPs)を、degenerate polymerase chain reaction (PCR)及びexpression sequence tag (EST) data searchを用いてヒトから2種類同定又はクローニングした(GenBank accession No. AB103375; GenBank accession No. AB103376)。これらのDSPは、現在、それぞれDUSP13、DUSP26として知られている。なお、DUSP13については、マウスホモログであるTMDP(testis-and skeletal-muscle-specific DSP)が知られている。TMDPは、マウスでは精巣、骨格筋に特異的に発現しており、マウス

のTMDPは、精子形成への関与が指摘されている(非特許文献6参照)。

- [0005] しかし、ヒトDUSP13、DUSP26の生理的役割については、何ら知られていなかった。また、心臓においてその生理的役割及び心疾患との関連について報告のあるチロシン脱リン酸化酵素についても何ら知られていなかった。

非特許文献1: Hunter T (1989) Cell. 58: 1013-1016

非特許文献2: Mustelin T (2002) Curr Dir Autoimmun. 5: 176-190

非特許文献3: Mustelin T et. al. (2002) Front Biosci. 7: 918-969

非特許文献4: Andersen JN et. al. (2004) FASEB J. 18: 8-30

非特許文献5: Alonso A et. al. (2004) Cell. 117: 699-711

非特許文献6: Biochem. J. (1999) 344: 819-825

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の課題は、心筋細胞の分化制御を司る脱リン酸化酵素ならびにその優性阻害酵素、さらにはこれらの酵素タンパク質をコードするDNAとそれらの利用法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、配列番号2に示されるアミノ酸配列や配列番号4に示されるアミノ酸配列が、心筋細胞の分化の制御に関与している二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) であることを見い出し、本発明を完成するに至った。また、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステインを他のアミノ酸に置換すると、二重特異性ホスファターゼ活性が失われること、さらに配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステインを他のアミノ酸に置換すると、二重特性ホスファターゼ活性が失われることを見い出し、本発明を完成するに至った。

- [0008] すなわち本発明は、(1)以下の(A)～(F)の何れかの塩基配列からなるDNAや、
(A)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列；
(B)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) 活性を有するタンパク質をコード

する塩基配列;

(C) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(D) 配列番号1の塩基番号78~674からなる塩基配列;

(E) 配列番号1の塩基番号78~674からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(F) 配列番号1の塩基番号78~674からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(2) 以下の(A)~(C)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質や、

(A) 配列番号2に示されるアミノ酸配列;

(B) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;

(C) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;

(3) 以下の(A)~(F)の何れかの塩基配列からなるDNAや、

(A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列;

(B) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ(Dual Specificity Phosphatase)活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(C) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(D) 配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列；

(E) 配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(F) 配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(4) 以下の(A)～(C)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質や、

(A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列；

(B) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列；

(C) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステインであり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列；

(5) 以下の(a)～(c)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質や、

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において138位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステインが他のアミノ酸に置換され、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(6) 以下の(a)～(c)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質や、

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において152位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステインが他のアミノ酸に置換され、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(c) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(7) 上記(5)に記載のタンパク質をコードする塩基配列からなるDNAや、(8) 上記(6)に記載のタンパク質をコードする塩基配列からなるDNAや、(9) タンパク質が、心筋細胞の分化を促進する活性を有することを特徴とする上記(4) 又は(5)に記載のタンパク質や、(10) タンパク質が、心筋細胞の分化を抑制する活性を有することを特徴とする上記(2) 又は(6)に記載のタンパク質に関する。

[0009] また本発明は、(11) 上記(4) 又は(5)に記載のタンパク質と、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグとが結合している融合タンパク質や、(12) 上記(2) 又は(6)に記載のタンパク質と、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグとが結合している融合タンパク質に関する。

[0010] さらに本発明は、(13) 上記(1)に記載のDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクターや、(14) 上記(3)に記載のDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクターや、(15) 上記(7)に記載のDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクターや、(16) 上記(8)に記載のDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクターに関する。

[0011] また本発明は、(17) 上記(13) 又は(14)に記載の組換えベクターが導入され、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現する形質転換体や、(18) 上記(15) 又は(16)に記載の組換えベクターが導入され、かつ二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を発現する形質転換体に関する。

[0012] さらに本発明は、(19) 上記(4) 若しくは(5)に記載のタンパク質、上記(11)に記載

の融合タンパク質、又は上記(14)若しくは(15)に記載の組換えベクターを含有することを特徴とする心筋細胞の分化促進剤や、(20) 上記(2)若しくは(6)に記載のタンパク質、上記(12)に記載の融合タンパク質、又は上記(13)若しくは(16)に記載の組換えベクターを含有することを特徴とする心筋細胞の分化抑制剤に関する。

[0013] また本発明は、(21) 上記(13)に記載の組換えベクターが導入され、上記(2)に記載のタンパク質を発現することができる形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、心筋細胞の分化の程度を測定・評価する工程を有する心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法や、(22) 上記(14)に記載の組換えベクターが導入され、上記(4)に記載のタンパク質を発現することができる形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、心筋細胞の分化の程度を測定・評価する工程を有する心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法や、(23) 上記(15)に記載の組換えベクターが導入され、上記(5)に記載のタンパク質を発現することができる形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、心筋細胞の分化の程度を測定・評価する工程を有する心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法や、(24) 上記(16)に記載の組換えベクターが導入され、上記(6)に記載のタンパク質を発現することができる形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、該心筋細胞の分化の程度を測定・評価する工程を有する心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法に関する。

[0014] さらに本発明は、(25) 上記(1)又は(3)に記載のDNAの、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を製造するための使用や、(26) 上記(5)又は(6)に記載のDNAの、二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を製造するための使用に関する。

[0015] また本発明は、(27) 上記(4)又は(5)に記載のタンパク質を用いて、心筋細胞の分化促進を活性化する方法や、(28) 上記(2)又は(6)に記載のタンパク質を用いて、心筋細胞の分化抑制を活性化する方法に関する。

[0016] さらに本発明は、(29) 上記(2)又は(4)に記載のタンパク質を用いて、リン酸化されたアミノ酸から脱リン酸化されたアミノ酸を製造する方法に関する。

[0017] また本発明は、(30) 上記(2)、(4)、(5)、(6)のいずれかのタンパク質に特異的に

結合する抗体に関する。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]ヒトDUSP13及びヒトDUSP26のアミノ酸配列、及びそれらをコードする塩基配列を示す図である。図中のグレイボックスは、脱リン酸化酵素の触媒ドメインを示す。また、図中の二重下線部は、抗体作製時にウサギに免疫した各々のペプチド配列を示す。

[図2]ヒトDUSP13とマウスDUSP13のアラインメント(図2左)及びヒトDUSP26とマウスDUSP26のアラインメント(図2右)を示す図である。図中のグレイボックスは、脱リン酸化酵素の触媒ドメインを示す。また、図中の二重下線部は、抗体作製時にウサギに免疫した各々のペプチド配列を示す。

[図3]ヒトDUSP13、ヒトDUSP26、及びそれらのCS変異体のインビトロ脱リン酸化活性試験の結果を示す図である。

[図4]ヒトDUSP13タンパク(左上及び左下)及びヒトDUSP26タンパク(右上)の細胞内の局在を示す図である。

[図5]左の図は、ヒトDUSP13タンパク、ヒトDUSP26等の細胞内の局在を示す図である。右の図は、ヒトDUSP13タンパク、ヒトDUSP26等の細胞内分画を示す図である。

[図6]左の図は、ヒトDUSP13の安定発現細胞の可溶分画における脱リン酸化活性を示す図である。また、中央の図は、ヒトDUSP26の安定発現細胞の可溶分画における脱リン酸化活性を示す図であり、右の図は、ヒトDUSP26の安定発現細胞の不溶分画における脱リン酸化活性を示す図である。

[図7]各組織におけるヒトDUSP13又はヒトDUSP26等のmRNAの発現を示す図である。

[図8]ヒト心臓におけるヒトDUSP13又はヒトDUSP26等のmRNAの発現を示す図である。

[図9]DUSP13のタンパクレベルでの内在性発現を示す図である。

[図10]心筋細胞の分化に対する、ヒトDUSP13及びその優性阻害酵素であるヒトDUSP13 C138Sの影響を経時的に示す図である。

[図11]心筋細胞の分化に対する、ヒトDUSP13及びその優性阻害酵素であるヒトDUSP13 C138Sの影響を経時的に示す図である。

[図12]心筋細胞の分化に対する、ヒトDUSP13、その優性阻害酵素であるヒトDUSP13 C138S、DUSP26、及びその優性阻害酵素であるDUSP26C152Sの影響を経時的に示す図である。

[図13]分化過程における筋管細胞の形成を示す光学顕微鏡の写真を示す図である。

[図14]阻害剤であるSB203580及びLY294002の心筋細胞の分化に対する影響を示す図である。

[図15]左上の図は、ヒトDUSP13のPI3 kinase – Akt経路に対する影響を示す図である。また、左下の図は、インビトロにおけるヒトDUSP13タンパクと、Akt1及びAkt2との結合を示す図であり、右の図はそれらをヒトDUSP13タンパクが脱リン酸化することを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0019] 本発明のDNAとしては、(1) – (A) 配列番号2に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列; (3) – (A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列; (1) – (B) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列; (3) – (B) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列; (1) – (C) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列; (3) – (C) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩

基配列; (1) - (D) 配列番号1の塩基番号78~674からなる塩基配列; (3) - (D) 配列番号3の塩基番号334~969からなる塩基配列; (1) - (E) 配列番号1の塩基番号78~674からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列; (3) - (E) 配列番号3の塩基番号334~969からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列; (1) - (F) 配列番号1の塩基番号78~674からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列; (3) - (F) 配列番号3の塩基番号334~969からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列; 及び後述の(a)~(c)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列; の何れかの塩基配列からなるDNAであれば特に制限されない。

[0020] また、本発明のタンパク質としては、(2) - (A) 配列番号2に示されるアミノ酸配列; (4) - (A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列; (2) - (B) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列; (4) - (B) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列; (2) - (C) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列; (4) - (C) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって

て、152位がシステインであり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列；(5)－(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列において138位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列；(6)－(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列において152位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列；(5)－(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステインが他のアミノ酸に置換され、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；(6)－(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステインが他のアミノ酸に置換され、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；(5)－(c)配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；(6)－(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質であれば特に制限されない。

[0021] ここで、「二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質」とは、リン酸化チロシンを脱リン酸化できるチロシンフォスファターゼにおいて、さらにリン酸化セリンあるいはリン酸化スレオニンを脱リン酸化する活性を有するタンパク質を意味する。あるタンパクが二重特異性ホスファターゼ活性を有するかどうかは、リン酸化されたERKやリン酸化されたMEK等の、リン酸化された適当な基質に適当な溶媒中でそのタンパクを作用させた場合に、リン酸化チロシンに加えて、リン酸化セリンあるいはリン酸化スレオニンが脱リン酸化されるかどうかを調べることによって容易に確認することができる。

[0022] ここで、「二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質」とは、例えば、二

重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質(以下、「タンパク質A」という)を、本発明の二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質(以下、「タンパク質B」という)と同じモル濃度で共存させた場合のタンパク質Bの脱リン酸化活性が、タンパク質Aを共存させなかった場合のタンパク質Bの脱リン酸化活性と比較して、90%以下、好ましくは70%以下、より好ましくは50%以下、さらに好ましくは30%以下となるようなタンパク質Aをいう。ここで、脱リン酸化活性を測定する際に用いる基質としては、公知のいずれか一つの基質でよく、例えばERK2を例示することができる。

[0023] なお、本発明のタンパク質のうち、(A)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質や、(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列において138位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質は、動物の心筋細胞の分化を調節する活性、特にラット心筋細胞の分化を促進する活性を有している。本発明のタンパク質のうち、(B)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列や、(C)配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステインであり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列や、(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステインが他のアミノ酸に置換され、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列や、(c)配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質は、動物の心筋細胞の分化を調節する活性を有していなくてもよいが、動物の心筋細胞の分化を調節する活性、特にラット心筋細胞の分化を促進する活性を有していることが好ましい。本発明における、動物の心筋細胞の分化を調節する活性とは、動物の心筋細胞の分化を促進又は抑制する活性をいい、ここでの動物は動物であれば特に制限さ

れないが、哺乳動物であることが好ましく、ヒト、ラット、マウス、ウサギであることがより好ましく、ヒト、ラット又はマウスであることがさらに好ましい。

[0024] また、本発明のタンパク質のうち、(A)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、動物の心筋細胞の分化を調節する活性、特にラット心筋細胞の分化を抑制する活性を有している。また、(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列において152位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質も、同様の効果を有している可能性がある。

本発明のタンパク質のうち、(B)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列や、(C)配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列や、(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステインが他のアミノ酸に置換され、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列や、(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質は、動物の心筋細胞の分化を調節する活性を有していなくてもよいが、動物の心筋細胞の分化を調節する活性、特にラット心筋細胞の分化を抑制する活性を有していることが好ましい。

[0025] あるタンパク質が、動物の心筋細胞の分化を促進する活性又は動物の心筋細胞の分化を抑制する活性を有しているかどうかは、例えば、ラット心筋細胞H9c2中で前記タンパク質を発現させて培養した場合に、その心筋細胞の分化の程度を、そのタンパク質を発現させないH9c2の分化の程度と比較することにより容易に確認することができる。分化の程度は、MyHC(Myosin Heavy Chain)、Myogenin、Troponin

Tのいずれか1つ以上のタンパクの発現レベルを確認することにより調べることができる。MyHC(Myosin Heavy Chain)、Myogenin、Troponin Tのタンパクは、いずれも分化が進むと発現量が増える傾向にある。ラット以外の動物についても、同様の方法によって、その心筋細胞の分化を促進又は抑制する活性を有しているかどうか容易に確認することができる。

[0026] 上記配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列からなるDNAとしてはヒトDUSP13(hDUSP13)遺伝子を、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質としてはヒトDUSP13タンパク質を、上記配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列からなるDNAとしてはヒトDUSP26(hDUSP26)遺伝子を、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質としてはヒトDUSP26タンパク質をそれぞれ挙げることができる。

[0027] 上記「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」とは、例えば1～20個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の任意の数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を意味する。また、上記「1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列」とは、例えば1～20個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の任意の数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を意味する。

[0028] 例えば、これら1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなるDNA(変異DNA)は、化学合成、遺伝子工学的手法、突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法により作製することもできる。具体的には、配列番号1や3に示される塩基配列からなるDNAに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的な手法等を用いて、これらDNAに変異を導入することにより、変異DNAを取得することができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. (以後「モレキュラークロニング第2版」と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載の方法に準じて行うことができる。この変異DNA

を適切な発現系を用いて発現させることにより、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質を得ることができる。また、同様の方法を用いて、配列番号2に示されるアミノ酸配列において138位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAや、配列番号4に示されるアミノ酸配列において152位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを取得でき、さらにこれらのDNAを適切な発現系を用いて発現させることにより、配列番号2に示されるアミノ酸配列において138位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質を得ることができる。

[0029] 上記「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列」とは、DNA又はRNAなどの核酸をプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブ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塩基配列を意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍程度の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）を用い、65℃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、モレキュラークローニング第2版等に記載されている方法に準じて行うことができる。

[0030] 例えば、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAを挙げることができ、例えば、プローブとして使用するDNAの塩基配列に対して60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAを好適に例示することができる。

[0031] 本発明のDNAの取得方法や調製方法は特に限定されるものでなく、本明細書中に開示した配列番号1や3に示される塩基配列情報又は配列番号2や4に示されるアミノ酸配列情報に基づいて適当なプローブやプライマーを調製し、それらを用いて当

該DNAが存在することが予測されるcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより目的のDNAを単離したり、常法に従って化学合成により調製することができる。

[0032] 具体的には、本発明のDNAが単離されたヒトより、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、次いで、このライブラリーから、本発明のDNAに特有の適当なプローブを用いて所望クローンを選抜することにより、本発明のDNAを取得することができる。上記cDNAの起源としては、ヒト由来の各種の細胞または組織を例示することができ、また、これらの細胞又は組織からの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。本発明のDNAをcDNAライブラリーからスクリーニングする方法は、例えば、モレキュラークローニング第2版に記載の方法等、当業者により常用される方法を挙げることができる。

[0033] また、上記(A)～(C)、(E)～(F)のいずれかに示される塩基配列からなる本発明の変異DNA又は相同DNAとしては、配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列又はその一部を有するDNA断片を利用し、他の生物体等より、該DNAのホモログを適当な条件下でスクリーニングすることにより単離することができる。その他、前述の変異DNAの作製方法により調製することもできる。

[0034] 本発明のタンパク質の取得・調製方法は特に限定されず、天然由来のタンパク質でも、化学合成したタンパク質でも、遺伝子組換え技術により作製した組換えタンパク質の何れでもよい。天然由来のタンパク質を取得する場合には、かかるタンパク質を発現している細胞又は組織からタンパク質の単離・精製方法を適宜組み合わせることにより、本発明のタンパク質を取得することができる。化学合成によりタンパク質を調製する場合には、例えば、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)等の化学合成法に従って本発明のタンパク質を合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して本発明のタンパク質を合成することもできる。遺伝子組換え技術によりタンパク質を調製する場合には、該タンパク質をコードする塩基配列からなるDNAを好適な発現系に導入することにより本発明のタンパク質を調製することができる。これらの中でも、比較的容易な操作でかつ大量に調製することが可能な遺伝子組換え技術による調製が好ましい

。

[0035] 例えば、遺伝子組換え技術によって、本発明のタンパク質を調製する場合、かかるタンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体等の抗体を結合させたカラムや、上記本発明のタンパク質に通常のペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、これらのタンパク質の精製物を得ることができる。また、本発明のタンパク質が細胞膜に発現している場合は、細胞膜分解酵素を作用させた後、上記の精製処理を行うことにより精製標品を得ることができる。

[0036] さらに、配列番号2や4に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2や4に示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質は、配列番号2や4に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の一例を示す配列番号1や3に示される塩基配列の情報に基づいて当業者であれば適宜調製又は取得することができる。例えば、配列番号1や3に示される塩基配列又はその一部を有するDNAをプローブとしてヒト以外の生物より、該DNAのホモログを適当な条件下でスクリーニングすることにより単離することができる。このホモログDNAの全長DNAをクローニング後、発現ベクターに組み込み適当な宿主で発現させることにより、該ホモログDNAによりコードされるタンパク質を製造することができる。

[0037] 本発明の融合タンパク質としては、上記本発明のタンパク質と、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグとが結合しているものであればどのようなものでもよい。マーカートンパク質としては、従来知られているマーカートンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、HRP(Horse Radish Peroxidase)等の酵素、抗体のFc領域、GFP(Green Fluorescent Protein)等の蛍光物質などを

具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、HA(hemagglutinin)、FLAG、Myc等のエピトープタグや、GST(glutathione S-transferase)、マルトース結合タンパク質、ビオチン化ペプチド、オリゴヒスチジン等の親和性タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合ペプチドは、常法により作製することができ、グルタチオンセファロースとGSTタグの親和性を利用した本発明のタンパク質の精製や、本発明のタンパク質の検出や、本発明のタンパク質に対する抗体の定量や、その他当該分野の研究用試薬としても有用である。

[0038] 本発明の組換えベクターとしては、前記本発明のDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクターであれば特に制限されず、本発明の組換えベクターは、本発明のDNAを発現ベクターに適切にインテグレートすることにより構築することができる。かかる発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製可能であるものや、あるいは宿主細胞の染色体中へ組込み可能であるものが好ましく、また、本発明のDNAを発現できる位置にプロモーター、エンハンサー、ターミネーター等の制御配列を含有しているものを好適に使用することができる。

[0039] 動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、pEGFP-C1(クローンテック社製)、pGBT-9(クローンテック社製)、pcDNA1(インビトロジェン社製)、pcDNA3.1(インビトロジェン社製)、pEF-BOS(Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、pAGE107(Cyto technology, 3, 133, 1990)、pCDM8(Nature, 329, 840, 1987)、pcDNA1/Amp(インビトロジェン社製)、pREP4(インビトロジェン社製)、pAGE103(J.Biochem., 101, 1307, 1987)、pAGE210等を例示することができる。動物細胞用のプロモーターとしては、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、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 α プロモーター等を挙げることができる。

[0040] 酵母用の発現ベクターとして、例えば、pYES2(インビトロジェン社製)、YEp13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、Ycp50(ATCC37419)、pHS19、pHS

15等を例示することができる。酵母用のプロモーターとしては、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、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを具体的に挙げるることができる。発現ベクターとしては、動物細胞用発現ベクターや、酵母用発現ベクター等を用いることができるが、動物細胞用発現ベクターを用いた組換えベクターが好ましい。

[0041] また、本発明の形質転換体としては、上記本発明の組換えベクターが導入され、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現する形質転換体であれば特に制限されず、形質転換動物(細胞、組織、個体)、形質転換酵母等を挙げるることができるが、形質転換動物(細胞、組織、個体)が好ましい。

[0042] 形質転換酵母の作製に用いられる宿主酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シズサッカロミセス・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*)等を挙げるることができる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロブラスト法、酢酸リチウム法等を挙げるることができる。

[0043] 本発明の心筋細胞の分化促進剤は、以下の(I)のタンパク質、以下の(II)の融合タンパク質、以下の(III)若しくは(IV)の組換えベクターのいずれかを含有している限り特に制限はされない。

(I) 以下の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質

(A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列;

(B) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;

(C) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステインであり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において138位のシステインが他のアミノ酸に

置換されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステインが他のアミノ酸に置換され、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(II) 上記(I)に記載のいずれかのタンパク質と、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグとが結合している融合タンパク質

(III) 以下の何れかの塩基配列からなるDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクター

(A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列；

(B) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(C) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(D) 配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列；

(E) 配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(F) 配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(IV) 以下の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを含み、かつ

二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクター

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において138位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列;

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステインが他のアミノ酸に置換され、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列;

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列;

[0044] 本発明の心筋細胞の分化抑制剤は、以下の(V)のタンパク質、以下の(VI)の融合タンパク質、以下の(VII)若しくは(VIII)の組換えベクターのいずれかを含有している限り特に制限はされない。

(V) 以下の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質

(A) 配列番号2に示されるアミノ酸配列;

(B) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;

(C) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において152位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列;

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステインが他のアミノ酸に置換され、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列;

(c) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列;

(VI) 上記(V)に記載のいずれかのタンパク質と、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグとが結合している融合タンパク質

(VII) 以下の何れかの塩基配列からなるDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクター

(A) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列;

(B) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(C) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(D) 配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列;

(E) 配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(F) 配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(VIII) 以下の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクター

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において152位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列;

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステインが他のアミノ酸

に置換され、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(c) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

[0045] 本発明の心筋細胞の分化調節剤(分化促進剤及び分化抑制剤)は、本発明の効果を妨げない限り、上述の必須成分の他に任意成分を含有していてもよい。本発明の心筋細胞の分化調節剤(分化促進剤及び分化抑制剤)は、心筋細胞の分化と関連した心疾患の予防・治療剤としての用途も期待される。

[0046] 本発明の心筋細胞の分化促進剤や分化抑制剤の使用方法は、心筋細胞の分化促進効果や分化抑制効果が得られる限り特に制限されないが、例えば、これらの剤に含まれる上記(III)や(IV)の組換えベクターを、心筋細胞中に導入するなどして、上記(I)のタンパク質や上記(II)の融合タンパク質を心筋細胞中で発現させること等により用いることができる。

ここで、心筋細胞としては、ヒト又は非ヒト哺乳動物の心筋細胞を好ましく例示することができる。非ヒト哺乳動物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ及びサルからなる群から選ばれる1種又は2種以上をより好ましく例示することができる。

[0047] 本発明の心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法としては、本発明の組換えベクターが導入され、かつ本発明のタンパク質を発現する形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、該心筋細胞の分化の程度を測定・評価する工程を有する方法であれば特に制限されるものではないが、より詳しくは、本発明の組換えベクターが導入され、かつ本発明のタンパク質を発現する形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、該心筋細胞の分化の程度を測定する工程と、前記形質転換心筋細胞を前記被検物質の非存在下で培養した場合の分化の程度と比較し、前記被検物質が心筋細胞の分化に与えた影響を評価する工程を有する。ここで心筋細胞としては、動物の心筋細胞をいい、好ましくは、動物の胎児の心

筋細胞等の、分化が終了していない、動物の心筋細胞をいう。動物としては、哺乳動物が好ましく、中でもヒト、マウス、ラット、ウサギ等がより好ましい。本スクリーニング方法に用いる形質転換体としては、形質転換動物をいう。形質転換動物における動物としては、ヒト又は非ヒト哺乳動物が好ましく、非ヒト哺乳動物の中でもマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ及びサルからなる群から選ばれる1種又は2種以上をより好ましく例示することができる。

[0048] なお、本発明の心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法には、心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質の評価方法も含まれ、例えば、心筋細胞の分化を促進又は抑制することが知られている物質を被検物質として用いることも含まれる。

[0049] 分化の程度は、MyHC(Myosin Heavy Chain)、Myogenin、Troponin Tのいずれか1つ以上のタンパクの発現レベルを確認することにより調べることができる。MyHC(Myosin Heavy Chain)、Myogenin、Troponin Tのタンパクは、いずれも分化が進むと発現量が増える傾向にある。ラット以外の動物についても、同様の方法によって、その心筋細胞の分化を促進又は抑制する活性を有しているかどうか容易に確認することができる。

[0050] 被検物質が心筋細胞の分化を促進する活性を有しているかどうかは、被検物質の存否以外は同様の好適な条件で心筋細胞を培養した場合に、該被検物質の存在下で培養した方が分化が進むことを確認することにより容易に調べることができる、また、被検物質が心筋細胞の分化を抑制する活性を有しているかどうかは、被検物質の存否以外は同様の好適な条件で心筋細胞を培養した場合に、該被検物質の存在下で培養した方が分化の進行が遅れることを確認することにより容易に調べることができる。

[0051] また、本発明の心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法は、心筋細胞の分化と関連した心疾患の予防・治療剤となり得る物質のスクリーニング方法への応用も期待される。

[0052] また、本発明における以下の(IX)のDNAは、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を製造するために使用することができる。

(IX) 以下の何れかの塩基配列からなるDNA

(A) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列;

(B) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(C) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(D) 配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列;

(E) 配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(F) 配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列;

(B) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(C) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(D) 配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列;

(E) 配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(F) 配列番号3の塩基番号334～969からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

[0053] また、本発明における以下の(X)のDNAは、二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を製造するために使用することができる。

(X) 以下の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において138位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステインが他のアミノ酸に置換され、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において152位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステインが他のアミノ酸に置換され、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

(c) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列；

[0054] また、本発明には、本発明における心筋細胞の分化を促進する活性を有するタンパク質を用いて、心筋細胞の分化促進を活性化する方法や、本発明における心筋細胞の分化を抑制する活性を有するタンパク質を用いて、心筋細胞の分化抑制を活性化する方法も含まれる。

- [0055] さらに、本発明には、本発明における二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を用いて、リン酸化されたアミノ酸から、脱リン酸化されたアミノ酸を製造する方法も含まれる。
- [0056] また、本発明の抗体は、DUSP13やDUSP26等の本発明のいずれかのタンパク質に特異的に結合する抗体である限り特に制限されない。本発明のいずれかのタンパク質(以下、「本発明のタンパク質」という)に特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは本発明のタンパク質を抗原として用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体は、例えば、本発明のタンパク質の変異又は欠失に起因する疾病の診断や本発明のタンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。
- [0057] 本発明のタンパク質に対する抗体は、慣用のプロトコールを用いて、動物(好ましくはヒト以外)に該タンパク質若しくはエピトープを含む断片、又は該タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法(Nature 256, 495-497, 1975)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Immunology Today 4, 72, 1983)及びEBV-ハイブリドーマ法(MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985)など任意の方法を用いることができる。
- [0058] また、本発明のタンパク質に対する一本鎖抗体をつくるためには、一本鎖抗体の調製法(米国特許第4,946,778号)を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、そのタンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。
- [0059] また上記の本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体等の抗体に、例えば、FITC(フルオレセインイソシアネート)又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の

蛍光物質や、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{35}S 又は ^3H 等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識したものや、グリーン蛍光タンパク質(GFP)等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を用いることによって、本発明のタンパク質の機能解析を行うことができる。また免疫学的測定方法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、血球凝集反応法、オクタロニー法等の方法を挙げることができる。

[0060] 「本発明のタンパク質に特異的に結合する」という語は、平衡解離定数 K_D が 10^{-7} ～ 10^{-10}M の範囲で、抗体が本発明のタンパク質と結合する能力を有することを意味する。本発明の方法によって産生される抗体またはその断片の平衡解離定数 K_D は当業者によって選択される任意の適切な方法によって決定することができる。

[0061] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例

[0062] 1. インビトロの脱リン酸化活性試験

ヒトHeLa細胞又はヒト組織由来のcDNAを鋳型としてPCRを行い、ヒトDUSP13をコードする遺伝子及びヒトDUSP26をコードする遺伝子をクローニングした。ヒトDUSP13をコードする遺伝子については、プライマーとして、配列番号5に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号6に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。また、ヒトDUSP26をコードする遺伝子については、プライマーとして、配列番号7に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号8に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。PCRは、High Fidelity DNA ポリメラーゼであるKOD-Plus- (東洋紡社製)を用い、 98°C で15秒間、 55°C で30秒間、 68°C で1分間を1サイクルとして、これを35サイクル行った(Perkin-Elmer社製のGene Amp PCR Systemを使用)。このように、ヒトDUSP13(hDUSP13)及びヒトDUSP26(hDUSP26)のクローニングを行った。それぞれのアミノ酸配列を、配列番号2及び配列番号4にそれぞれ示す。また、ヒトDUSP13及びヒトDUSP26のそれぞれの脱リン酸化酵素の触媒ドメインを図1及び図2のグレイボックスに示す。この触媒ドメインは

これまでに報告されたDSPsと同様に保存されている。図中、抗体作製時にウサギに免疫した各々のペプチド配列(図1及び図2の二重下線部)を示す。

- [0063] ヒトDUSP13タンパクやヒトDUSP26タンパクが脱リン酸化酵素活性を有するかどうかを確かめるために、以下のような実験を行った。
- [0064] 上述のPCRにより得られたヒトDUSP13タンパクをコードするDNA及びヒトDUSP26タンパクをコードするDNAをそれぞれ、GST遺伝子を有するpGEX(Amersham Biosciences)ベクターにつなぎ、該ベクターで大腸菌を形質転換して、GST(glutathione S-transferase) 融合タンパクを大腸菌内で発現させた。これらの融合タンパクを、グルタチオンセファロース4B(Amersham Biosciences)を用いてアフィニティ精製した。このようにしてヒトDUSP13タンパク、ヒトDUSP26タンパクを精製した。
- [0065] 一方、部位特異的変異導入法を用いて、ヒトDUSP13タンパクの138番目のシステインがセリンに置換されたタンパクをコードするDNAを作製した。このDNAをpGEXベクターにつなぎ、該ベクターで大腸菌を形質転換して、GST(glutathione S-transferase) 融合タンパクを大腸菌内で発現させた。この融合タンパクを、グルタチオンセファロース4B(Amersham Biosciences)を用いてアフィニティ精製した。このようにして138番目のシステインがセリンに置換されたヒトDUSP13タンパク(以下、「DUSP13 C138Sタンパク」という)を精製した。同様の方法により、152番目のシステインがセリンに置換されたヒトDUSP26タンパク(以下、「DUSP26 C152Sタンパク」という)を精製した。
- [0066] 精製して得られたヒトDUSP13タンパク、ヒトDUSP26タンパク、DUSP13 C138Sタンパク、DUSP26 C152Sタンパクの脱リン酸化酵素活性を、パラニトロフェニルフォスフェート(pNPP)を基質として測定した。また、チロシン脱リン酸化酵素阻害剤であるソディウムバナデート(Vanadate)をパラニトロフェニルフォスフェートに添加して、同様の脱リン酸化酵素活性試験を行った。その結果を図3に示す。なお、DUSP19とは、本発明者らが既に単離したヒトDUSPタンパク質である。
- [0067] 図3左上及び図3中央上の結果から分かるように、ヒトDUSP13タンパク及びヒトDUSP26タンパク(以下、「野生型タンパク」という)においては、脱リン酸化酵素活性が時間依存的及び量依存的に検出された。一方、DUSP13 C138Sタンパク及び

DUSP26 C152Sタンパク(以下、「CS変異体タンパク」という)には、脱リン酸化酵素活性が認められなかった。また、チロシン脱リン酸化酵素阻害剤であるソディウムバナデート(Vanadate)の存在下(濃度1mM)では、野生型タンパクにも脱リン酸化酵素活性が認められなかった。このことは、かかるCS変異体タンパクが酵素活性欠失タンパクとして優性阻害酵素の機能を持ち得ることを示唆した。

[0068] また、ヒトDUSP13タンパクが、脱リン酸化酵素の中でも、リン酸化チロシン、リン酸化セリン及びリン酸化スレオニンのリン酸基を脱リン酸化するDSP (Dual Specificity Phosphatase)であることを示すために、活性化された際に、既知のチロシン及びスレオニンが同時にリン酸化されるERK2タンパク、あるいはセリンがリン酸化されるMEK1タンパクを基質として用いた。

[0069] ERK2をコードするDNAに、GSTタグをコードするDNAをつなげてベクターに乗せ、該ベクターをHeLa細胞に形質導入し、GST-ERK2タンパクを発現させた。8時間の血清除去後、ERK2を活性化することが知られるホルボールエステル(Treatment)でこの細胞を処理し、GST-ERK2タンパクにおける既知のチロシン及びスレオニンを同時にリン酸化させた。このGST-ERK2タンパクを、グルタチオンセファロースを用いて沈殿させ、そこに所定量のヒトDUSP13タンパクを添加し又は添加せずに、バッファー中において37℃で60分間アッセイを行った。アッセイの後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、抗リン酸化スレオニン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、GST-ERK2タンパクの特定のスレオニン(Thr)残基の脱リン酸化の程度を検出した(図3左下の上から1番目のパネル参照)。また、抗リン酸化スレオニン抗体の代わりに、抗リン酸化チロシン抗体を用いて同様の実験を行い、GST-ERK2タンパクの特定のチロシン(Tyr)残基の脱リン酸化の程度を検出した(図3左下の上から2番目のパネル参照)。また、ERKの活性化の際にリン酸化されるスレオニン残基及びチロシン残基を認識する抗リン酸化ERK抗体を用いて同様の実験を行ったが、これらの残基の脱リン酸化の程度は、ヒトDUSP13タンパクの濃度にほとんど依存しないことを確認した(図3左下の上から3番目のパネル参照)。また、抗リン酸化スレオニン抗体の代わりに、抗ERK抗体を用いて同様の実験を行い(図3左下の上から4番目のパネル参照)、どのレーンにもGST-ERK2タンパクが

ほぼ同量含まれていることを確認した。なお、一番左のレーンは、ERK2を活性化することが知られるホルボールエステルで処理しておらず、他のレーンとの比較により、非活性型のERK2におけるチロシンやスレオニンのリン酸化の程度が低いことが示される。

[0070] MEK1をコードするDNAに、HAタグをコードするDNAをつなげてベクターに乗せ、該ベクターをHeLa細胞に形質導入し、HA-MEK1タンパクを発現させた。MEK1を活性化することが知られている血清刺激 (serum) でこの細胞を処理し、HA-MEK1タンパクの217番目のセリン (Ser) 残基をリン酸化させた。このHA-MEK1タンパクを、抗HA抗体 (anti-HA) にて免疫沈降を行い (IP: immunoprecipitation)、そこに所定量のヒトDUSP13タンパクを添加し又は添加せずに、バッファー中において37℃で60分間アッセイを行った。アッセイの後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、前述のセリン残基のリン酸化を検知する抗リン酸化MEK1/2抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、HA-MEK1タンパクの特定のセリン残基の脱リン酸化の程度を検出した (図3中央下の上から1番目のパネル参照)。なお、一番左のレーンは、MEK1を活性化することが知られる血清刺激処理をしておらず、他のレーンとの比較により、非活性型のMEK1におけるセリンのリン酸化の程度が低いことが示される。

[0071] 2. インビボの脱リン酸化活性試験

ヒトDUSP13タンパク及びヒトDUSP26タンパクが細胞内においても脱リン酸化酵素活性を持ち得るかどうかを確認するために、まず各々の細胞内局在を調べた。N末にMycタグを付けたヒトDUSP13タンパクをコードするDNAを哺乳動物発現ベクター (pMEベクター) に組換えした後、該ベクターをHeLa細胞に導入して、該組み換えタンパクを一過性に発現させた。DNA導入10時間後において、細胞を4%パラホルムアルデヒドにて室温、15分間での固定を行い、その後、0.2%のトライトンX-100を用いて膜の透過処理をした。処理後、抗Myc抗体 (9E10) を一次抗体として反応させて、洗浄した後、FITC (fluorescein isothiocyanate) でラベルされた抗マウスIgG二次抗体を反応させて細胞免疫染色を行った。細胞免疫染色を行った細胞を共焦点顕微鏡で観察し、ヒトDUSP13タンパクの局在を調べた。また、N末にMycタグ

を付けたヒトDUSP26タンパクをコードするDNAを哺乳動物発現ベクター(pMEベクター)に組換えした後、該ベクターをHeLa細胞に導入して、該組み換えタンパクを一過性に発現させた。前述同様に、DNA導入10時間後、抗Myc抗体(9E10)を一次抗体として反応させて、洗浄した後、FITCでラベルされた抗マウスIgG二次抗体を反応させて細胞免疫染色を行った。細胞免疫染色を行った細胞を共焦点顕微鏡で観察し、ヒトDUSP26タンパクの局在を調べた。これらの結果を図4及び図5左に示す。なお、図4の左下は、DUSP13を一過性発現させた上記HeLa細胞を、FITCでラベルされた抗マウスIgG二次抗体を用いて、DUSP13を免疫染色すると共に、Rhodamineでラベルされたファロイジン(インビトロジェン社製)を用いて細胞染色したものを示す。ファロイジンはアクチンに結合し細胞膜の局在を示し、今回の実験においては、Rhodamineによって赤色の蛍光像で見える。そのため、DUSP13の局在を示すFITCの緑色と重なると黄色に見える。図4左下では、核は緑色に見え、細胞膜が黄色く見えた。

図4及び図5左から分かるように、ヒトDUSP13タンパクは、核周囲及び細胞膜に局在が認められ、ヒトDUSP26タンパクは、核及び核周囲に局在が認められた。

[0072] 3. ヒトDUSP13及びヒトDUSP26の細胞内分画における脱リン酸化活性試験

次に、上記の両組み換えタンパクを発現させた両細胞の細胞抽出液を細胞質、膜系細胞小器官、核、細胞骨格にて分画した。得られたそれぞれのサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)した後、抗Myc抗体を用いたウェスタンブロッティングにてそれらの細胞内分画を検出した。その結果を図5右の一番上のパネルに示す。

図5右の一番上のパネルから分かるように、ヒトDUSP13タンパクは細胞質画分(F1:Cytosol)及び膜系細胞小器官画分(F2:Membrane/Organelle)に存在することが認められ、一方、ヒトDUSP26タンパクは細胞骨格画分(F4:Cytoskeleton)に存在することが認められた。

[0073] また、EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein)タグをN末に付加した、ヒトDUSP13タンパク及びヒトDUSP26タンパクをコードするDNAを哺乳動物発現ベクター(pEGFP-C3: クローンテック社)に組換えした後、該ベクターをHeLa細胞に導入した

。導入後、750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のG418を含む選択培地にて3週間培養を行い、各々の安定発現細胞株 (GFP-DUSP13/HeLa、GFP-DUSP26/HeLa)を作製し、いくつかのクローンを得た。同様に、DUSP13の138番目のシステイン (Cys)がセリン (Ser)に置換された変異体、及びDUSP26の152番目のシステイン (Cys)がセリン (Ser)に置換された変異体の安定発現細胞株 (GFP-DUSP13 C138S/HeLa、GFP-DUSP26 C152S/HeLa)を作製した。作製後、これらを用いて、細胞内局在ならびに細胞内分画を調べたところ、図4及び図5と同様の結果を得た。

[0074] 4. ヒトDUSP13又はヒトDUSP26の安定発現細胞の細胞内分画における脱リン酸化活性試験

次に、これらの安定発現細胞株GFP-DUSP13/HeLa、GFP-DUSP26/HeLa、GFP-DUSP13 C138S/HeLa、GFP-DUSP26 C152S/HeLaを用いて、発現させたタンパクの細胞内分画における脱リン酸化酵素活性を確認した。各々において作製した安定発現細胞株のクローン番号を括弧内に示す。GFP-DUSP13/HeLa (DUSP13/HeLa (4-1)) 及びGFP-DUSP13 C138S/HeLa (DUSP13 C138S/HeLa (9-2)) については、発現させたこれらの細胞内タンパクを、安定発現細胞株から抗DUSP13抗体を用いて免疫沈降し (IP: immunoprecipitation)、その脱リン酸化酵素活性をパラニトロフェニルフォスフェート (pNPP) を基質として測定した。その結果、DUSP13/HeLa (4-1) からの抗DUSP13抗体による免疫沈降物の酵素活性は、Vector/HeLa 及びDUSP13 C138S/HeLa (9-2) からの免疫沈降物と比較してより高い脱リン酸化酵素活性を認めた。このことはDUSP13タンパクが細胞内においても酵素活性を有することを示唆した (図6左)。また、Vector/HeLaを用いた場合と同様に、DUSP13 C138S/HeLaを用いた場合は、抗DUSP13抗体を用いて免疫沈降した場合 (DUSP13 IP+) と、該抗体を用いた免疫沈降を行わなかった場合 (DUSP13 IP-) とで脱リン酸化酵素活性に有意な差が見られなかったことから、DUSP13 C138Sは細胞内でも脱リン酸化活性がないことが確認された (図6左)。

[0075] 一方、Vector/HeLa、GFP-DUSP26/HeLa (DUSP26/HeLa (5))、GFP-DUSP26 C152S/HeLa (DUSP26 C152S/HeLa (2)) のそれぞれのト

ライトン可溶画分について、抗GFP抗体を用いて免疫沈降した(IP:immunoprecipitation)サンプル(GFP IP+)と免疫沈降しなかったサンプル(GFP IP-)を作製した。そこで、これらの各サンプルについてパラニトロフェニルフォスフェート(pNPP)を基質とした脱リン酸化酵素活性の測定を行った。その結果、いずれの細胞のサンプルにおいても、抗GFP抗体で免疫沈降したものと免疫沈降しなかったものとの間で脱リン酸化酵素活性の差が見られず(図6中央の下パネル参照)、いずれの細胞にも細胞内脱リン酸化酵素活性が可溶画分には認められなかったことが示された。次に、これらの各サンプルについて抗GFP抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、32.5Kより下に特異的なバンドが確認された(図6中央の上パネル2番目のレーン参照)。この32.5Kのバンドは、Vector/HeLaにおいてのみ検出されていることから、EGFPそのものの発現を意味する。一方、他のサンプルにおいては、EGFPを付加したDUSP26を示唆する47.5K付近のバンドが検出されなかった。このことから、前述の結果に一致して、DUSP26/HeLa(5)及びDUSP26 C152S/HeLa(2)のいずれの細胞においても、DUSP26が可溶画分に存在しないことが示された。

そこで、DUSP26の発現を認めたライトン不溶画分に、パラニトロフェニルフォスフェート(pNPP)を基質として加え、その脱リン酸化酵素活性を測定した。その結果、DUSP26/HeLa(5)からの不溶画分には、Vector/HeLa及びDUSP26 C152S/HeLa(2)からの不溶画分と比較して、より高い脱リン酸化酵素活性を検出した(図6右)。この結果とDUSP26の細胞内分画(図5)における結果から、DUSP26が細胞骨格上において活性を有することが示唆された。

[0076] 5. 各組織におけるヒトDUSP13又はヒトDUSP26等のmRNAの発現

ヒト及びマウス組織における各々のmRNAの発現レベルについて、各組織のfirst-strand cDNAを特異的なプライマーにてPCR増幅し、G3PDHを内部標準として半定量PCRにて検出した。その結果、ヒトにおいては、各mRNA共に心臓(heart)に発現を認めたが(図7左)、マウスにおいては、各mRNAの心臓での発現は検出できず、また各々に明らかな組織特異性を認めた(図7右)。一方、本発明者が既に単離したhDUSP22、hDUSP14ならびにhDUSP19については、そのmRNAに組織特

異性は認められなかった(図7)。さらに、ヒト心臓においては、各mRNA共に胎児よりも成人において発現が増し(図8)、hDUSP13については、左右の心房、心耳、心室、ならびに心室間中隔、房室結節において発現を認めたが、hDUSP26については、心尖部、左心房、ならびに心室間中隔においてのみ発現が検出され、左右心室には明らかな発現は認められなかった(図8)。

[0077] 6. DUSP13のタンパクレベルでの内在性発現

次に、DUSP13のタンパクレベルでの内在性発現を確認するために、上記mRNAにて発現が確認されたヒト心臓及びヒト骨格筋衛星細胞(SkMC)の細胞抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)し、その後、抗DUSP13抗体にてウェスタンブロッティングを行った。その結果、予測された分子量23kDa付近にDUSP13の発現を検出したが、ヒト脳、ヒト冠状動脈内皮細胞においては認められなかった(図9中央)。一方、DUSP22については、ヒト脳、心臓、骨格筋細胞及び冠状動脈内皮細胞のいずれにおいても、抗DUSP22抗体を用いた同一メンブレン上でのウェスタンブロッティングによって発現を認めた(図9中央)。

DUSP13に対する抗体(anti-DUSP13)は、hDUSP13のN末端から17アミノ酸残基からなるペプチド(図1左及び図2左の二重下線部参照)をウサギに免疫し、血清をIgG精製後作製したもので、大腸菌で発現、精製した各DSP組換えタンパクに対し、DUSP13にのみ特異的に反応することを認めている(図9左)。また、筋肉細胞の分化過程におけるDUSP13の発現変化を調べるために、ヒト骨格筋衛星細胞SkMCを分化後、そのタンパクレベルの発現をウェスタンブロッティングにて検出した。結果は、タンパクレベルにおいては、分化後1日目より増加を認め、その後3日目より減少し(図9右の一番上のパネル)、同様の結果がmRNAレベルにおいても得られた。

[0078] 7. DUSP13の心筋細胞分化に対する影響

次に、哺乳動物心筋細胞における該タンパクの生理的役割を調べるために、ラット胎児心筋細胞H9c2を用いて、各野生型タンパク及びその優性阻害タンパクであるCS変異体の安定発現細胞株を、コントロールとしてのVector/H9c2と共に得た。その後、各々のクローンを血清除去により分化させ、ウェスタンブロッティングによる分化指標の検出(図10)、細胞免疫染色(図11及び図12)及び形態学的観察(図13)

により、各々の脱リン酸化酵素の心筋細胞分化に対する影響を調べた。その結果、分化させた各々の細胞抽出液におけるウェスタンブロッティングにおいては、Vector／H9c2が、経時的に筋分化指標となるMyHC(Myosin Heavy Chain)、Myogenin、Troponin Tを発現して行くのに対し、DUSP13／H9c2はVector／H9c2に比べて発現が抑制されており、また一方でDUSP13 C138S／H9c2においては、これらの発現が促進されていることが示された(図10)。一方、DUSP26については、DUSP26／H9c2は、Vector／H9c2と比較して早い時期より筋分化指標の発現を認め、DUSP26 C152S／H9c2はほとんど発現を認めなかった。このことは、二重特異性ホスファターゼ(Dual Specificity Phosphatase)であるDUSP26及びDUSP13が、互いに異なる細胞内標的分子を特異的に脱リン酸化することを示唆した。

[0079] 次に、このことをさらに確認するために、上記安定発現細胞株において、筋分化指標であるMyHCに対しては抗MyHC抗体を、核に対してはHoechst33258を用いて、細胞免疫染色を経時的に行った。各々、蛍光像としてMyHCは赤色に、核は青色で観察される。その結果、DUSP13／H9c2はVector／H9c2と比較してMyHCの発現が経時的に抑制されており、一方、DUSP13 C138S／H9c2は、かかる発現が促進されていることが示された(図11)。また、DUSP26／H9c2は、Vector／H9c2と比較して早くからMyHCの発現を認め、DUSP26 C152S／H9c2においては、ほとんど発現を認められなかった(図12)。さらに、これらに一致する結果は、分化過程における筋管細胞の形成(図13中の黒三角の先端参照)の有無等の、光学顕微鏡を用いた形態学上の観察においても確認された(図13)。

[0080] 8. DUSP13の基質の検討

DUSP13が心筋分化を抑制することから、その標的となる生理的基質を求めることにした。ここで、これまでに分化シグナルとして報告のあるp38MAPK経路あるいはPI3 kinase－Akt経路が、H9c2における分化においても関与しているかをまず調べた。作製した安定発現細胞株と共にその親株であるH9c2に、各々の阻害剤であるSB203580及びLY294002を分化培地に加え、vehicleであるDMSOをコントロールとして加えた後、血清除去にて分化させた。分化の指標としては、前述の通り形態学的観察、細胞免疫染色(図14)、ウェスタンブロッティングによる分化指標の検出

にて行い、その結果、いずれの阻害剤もDMSOと比較して、親株を含むすべての細胞株の分化を抑制することが示された。このことは、p38MAPK経路及びPI3 kinase-Akt経路のいずれもがH9c2の分化に必要であることを意味した。

[0081] そこで、DUSP13は、これらの経路に関与するシグナル分子を脱リン酸化することで、かかる経路を抑制し、結果的に分化の抑制をすると考え、各経路のシグナル分子に対するDUSP13の影響を調べた。そこで、各安定発現細胞株、DUSP13/H9c2、Vector/H9c2、DUSP13 C138S/H9c2を分化させ、その細胞抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)後、各経路の活性を表す抗リン酸化抗体にてウェスタンブロッティングを行った。結果は、PI3 kinase-Akt経路において、Aktの活性型を示すSer473のリン酸化が、Vector/H9c2と比較してDUSP13/H9c2において抑制されており、また一方でDUSP13 C138S/H9c2は促進していることが示された(図15左上)。このことは、DUSP13がPI3 kinase-Akt経路の調節に関与していることを示唆し、Aktを含めその経路のシグナル分子を脱リン酸化する可能性を示した。また、DUSP13は、インビトロにおいて、AktのアイソフォームであるAkt1及びAkt2と結合し(図15左下)、またこれらのリン酸化Ser473を直接脱リン酸化することを示した(図15右の上から2番目のパネル参照)。また、各安定発現細胞株、DUSP26/H9c2、Vector/H9c2、DUSP26 C152S/H9c2を分化させ、その細胞抽出液をAktの活性型を認識する抗リン酸化Akt(Ser473)抗体及び抗リン酸化Akt(Thr308)抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、両者共にDUSP26/H9c2においてはVector/H9c2と比較してAktのリン酸化が促進されており、一方、DUSP26 C152S/H9c2は抑制されていることが示された。このことは、DUSP26もまたAkt経路の調節に関与していることを示唆した。

産業上の利用可能性

[0082] 本発明のタンパク質は、心筋細胞の分化制御を司る脱リン酸化酵素又はその優性阻害酵素であり、心筋細胞の分化を調節する活性を有している。本発明のタンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含む組換えベクターは、心筋細胞の分化調節剤として用いることができ、また心筋細胞の分化と関連した心疾患の予防・

治療剤としての用途も期待される。

また、本発明の組換えベクターが導入された形質転換体は、例えば被検物質の存在下で培養し、心筋細胞の分化の程度を測定・評価することにより、心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法に用いることができる。また、同様のスクリーニング方法は、心筋細胞の分化と関連した心疾患の予防・治療剤となり得る物質のスクリーニング方法への応用も期待される。本発明における分化調節剤や、心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質は、心臓の再生医学への応用も期待される。

すなわち、心臓の再生医学においては、幹細胞から心筋細胞等を誘導し、それを人体に効率良く移植する方法が不可欠と考えられているが、このような状況において、本発明における心筋細胞の分化調節剤や、心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質は、移植に用いる心筋細胞をより効率よく製造したり、再生した心臓を患者に移植した際の定着率を上げる等の心臓の移植効率を上げることに有用であると考えられる。

請求の範囲

- [1] 以下の(A)～(F)の何れかの塩基配列からなるDNA。
- (A) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列;
 - (B) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;
 - (C) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;
 - (D) 配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列;
 - (E) 配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;
 - (F) 配列番号1の塩基番号78～674からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、138位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;
- [2] 以下の(A)～(C)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (A) 配列番号2に示されるアミノ酸配列;
 - (B) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;
 - (C) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;
- [3] 以下の(A)～(F)の何れかの塩基配列からなるDNA。
- (A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列;
 - (B) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは

は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ (Dual Specificity Phosphatase) 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(C) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステインであるアミノ酸配列からなり、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(D) 配列番号3の塩基番号334~969からなる塩基配列;

(E) 配列番号3の塩基番号334~969からなる塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

(F) 配列番号3の塩基番号334~969からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ、152位がシステインであり、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列;

[4] 以下の(A)~(C)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

(A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列;

(B) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;

(C) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステインであり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ活性を有するアミノ酸配列;

[5] 以下の(a)~(c)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において138位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列;

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、138位のシステインが他のアミノ酸に置換され、138位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列;

- (c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、138位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列;
- [6] 以下の(a)～(c)の何れかのアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において152位のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列;
- (b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、152位のシステインが他のアミノ酸に置換され、152位のシステイン以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列;
- (c) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、152位がシステイン以外のアミノ酸であり、かつ該アミノ酸配列からなるタンパク質が二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するアミノ酸配列;
- [7] 請求項5に記載のタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA。
- [8] 請求項6に記載のタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA。
- [9] タンパク質が、心筋細胞の分化を促進する活性を有することを特徴とする請求項4又は5に記載のタンパク質。
- [10] タンパク質が、心筋細胞の分化を抑制する活性を有することを特徴とする請求項2又は6に記載のタンパク質。
- [11] 請求項4又は5に記載のタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとが結合している融合タンパク質。
- [12] 請求項2又は6に記載のタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとが結合している融合タンパク質。
- [13] 請求項1に記載のDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクター。
- [14] 請求項3に記載のDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクター。
- [15] 請求項7に記載のDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタ

ンパク質を発現することができる組換えベクター。

- [16] 請求項8に記載のDNAを含み、かつ二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を発現することができる組換えベクター。
- [17] 請求項13又は14に記載の組換えベクターが導入され、かつ二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を発現する形質転換体。
- [18] 請求項15又は16に記載の組換えベクターが導入され、かつ二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を発現する形質転換体。
- [19] 請求項4若しくは5に記載のタンパク質、請求項11に記載の融合タンパク質、又は請求項14若しくは15に記載の組換えベクターを含有することを特徴とする心筋細胞の分化促進剤。
- [20] 請求項2若しくは6に記載のタンパク質、請求項12に記載の融合タンパク質、又は請求項13若しくは16に記載の組換えベクターを含有することを特徴とする心筋細胞の分化抑制剤。
- [21] 請求項13に記載の組換えベクターが導入され、請求項2に記載のタンパク質を発現することができる形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、心筋細胞の分化の程度を測定・評価する工程を有する心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法。
- [22] 請求項14に記載の組換えベクターが導入され、請求項4に記載のタンパク質を発現することができる形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、心筋細胞の分化の程度を測定・評価する工程を有する心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法。
- [23] 請求項15に記載の組換えベクターが導入され、請求項5に記載のタンパク質を発現することができる形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、心筋細胞の分化の程度を測定・評価する工程を有する心筋細胞の分化を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法。
- [24] 請求項16に記載の組換えベクターが導入され、請求項6に記載のタンパク質を発現することができる形質転換心筋細胞を、被検物質の存在下で培養し、該心筋細胞の分化の程度を測定・評価する工程を有する心筋細胞の分化を促進又は抑制する物

質のスクリーニング方法。

- [25] 請求項1又は3に記載のDNAの、二重特異性ホスファターゼ活性を有するタンパク質を製造するための使用。
- [26] 請求項5又は6に記載のDNAの、二重特異性ホスファターゼ阻害活性を有するタンパク質を製造するための使用。
- [27] 請求項4又は5に記載のタンパク質を用いて、心筋細胞の分化促進を活性化する方法。
- [28] 請求項2又は6に記載のタンパク質を用いて、心筋細胞の分化抑制を活性化する方法。
- [29] 請求項2又は4に記載のタンパク質を用いて、リン酸化されたアミノ酸から脱リン酸化されたアミノ酸を製造する方法。
- [30] 請求項2、4、5、6のいずれかのタンパク質に特異的に結合する抗体。

hDUSP13

[illegible]

hDUSP26

[illegible]

[X]2]

human DUSP13 1:MDSLQGGDERRKINGAVQASPYQPTLASLQRLKVRQAALNHHDEYM:50
mouse DUSP13 1:.....E.....V.....P.....T.....N.....:50

human DUSP13 51:PEIFDGGAYAAADRSKLIQLGITHVYNAAGKFOYDIGAKFYTGMSLEYV:100
mouse DUSP13 51:N.....GR.....V.....TP.....:100

human DUSP13 101:GTAADNPPEDLSVYPLPVAVIRALSVFQGRVIVHCKMGVGSRSATIVL:150
mouse DUSP13 101:.....H.....D.NI.RS.....X.....:150

human DUSP13 151:REFMCKNNNTLVEAIQTVOAHENI⁺NSGSLRQLQVLDHRLGRTGRF:200
mouse DUSP13 151:.....F.....D.....R.....D.....:200

human DUSP26 1:XCFGNWLVASMTFMAEFSSRSRSPETROTLEEMPTVOHFFLVNVELEK:50
mouse DUSP26 1:.....G.....S.....S.R.....:50

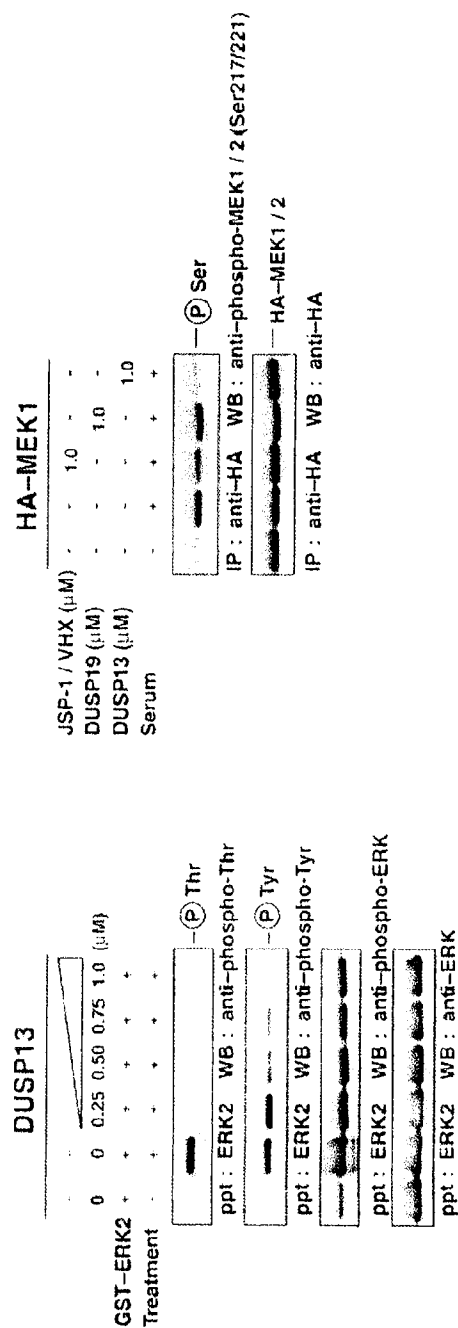
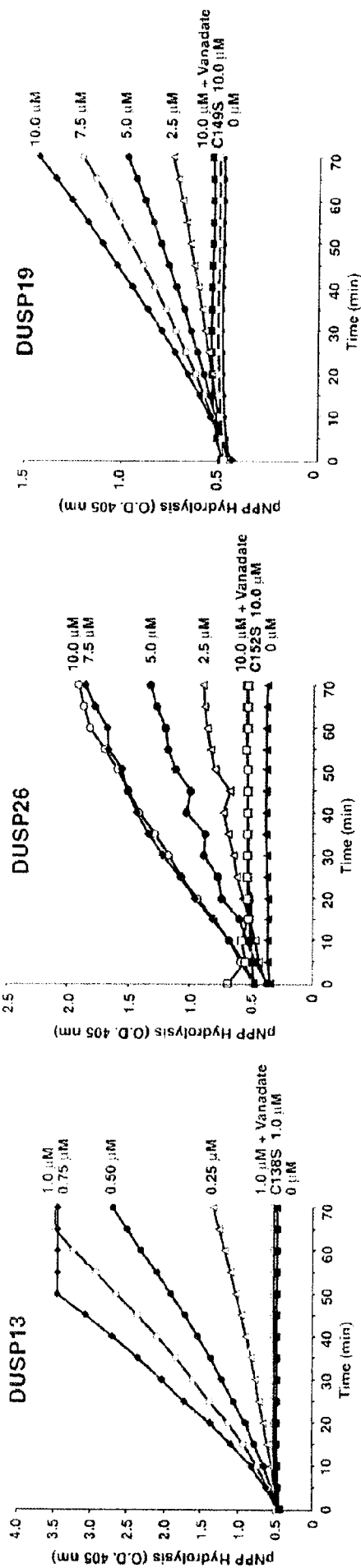
human DUSP26 51:LLVTKTACNADDEVKGLYLGQDMANNREELRLGITVYLVNASSSRWR:100
mouse DUSP26 51:.....N.....:100

human DUSP26 101:GTEFAVSGLGIRYLVVEAH⁺SPAFDMSIHPTAADFIRHALLSQPGCKIIV:150
mouse DUSP26 101:.....I.....:150

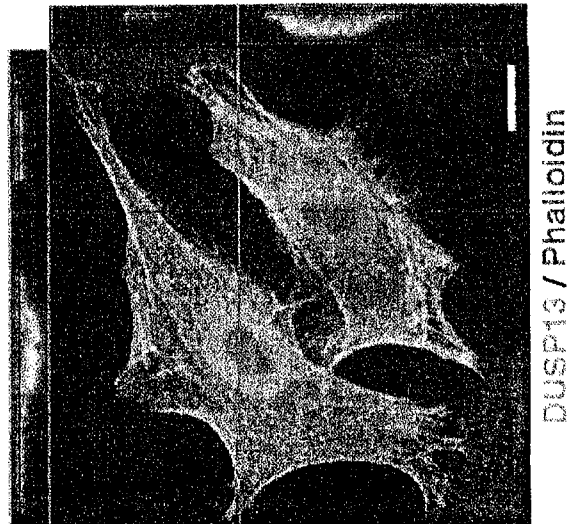
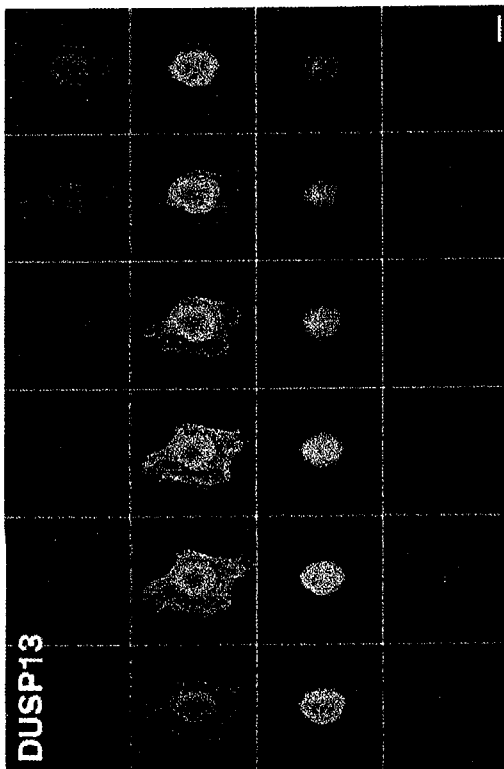
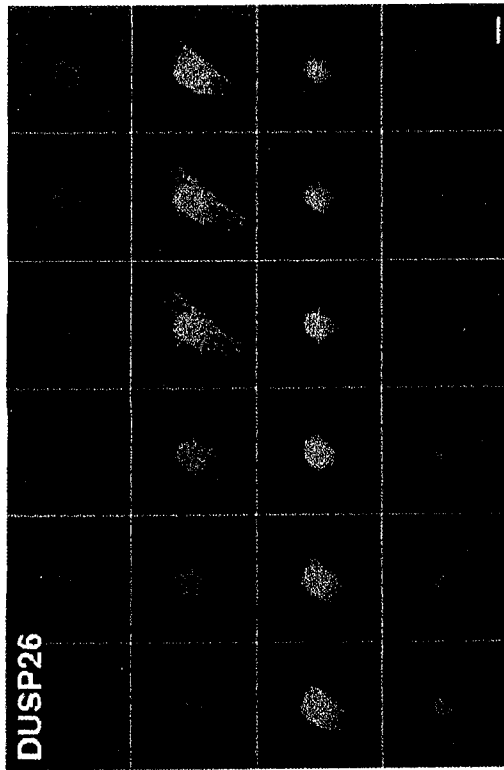
human DUSP26 151:KQVGVSRSATLVLAIVL⁺YHLLTIVEAIKKVKDHGCIIPNRGFLRQLLA:200
mouse DUSP26 151:.....F.....T.....:200

human DUSP26 201:LDHSLRQGEA:211
mouse DUSP26 201:.....211

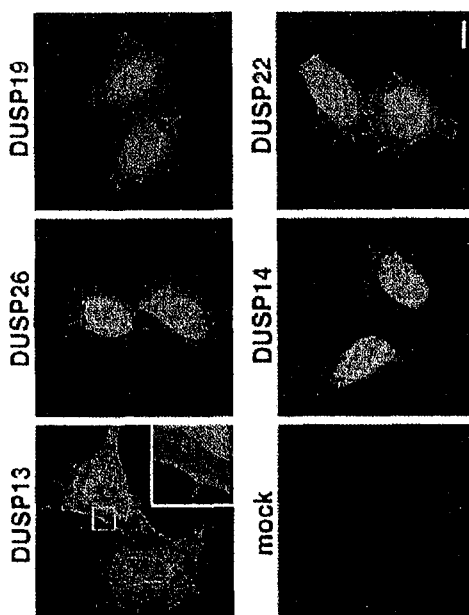
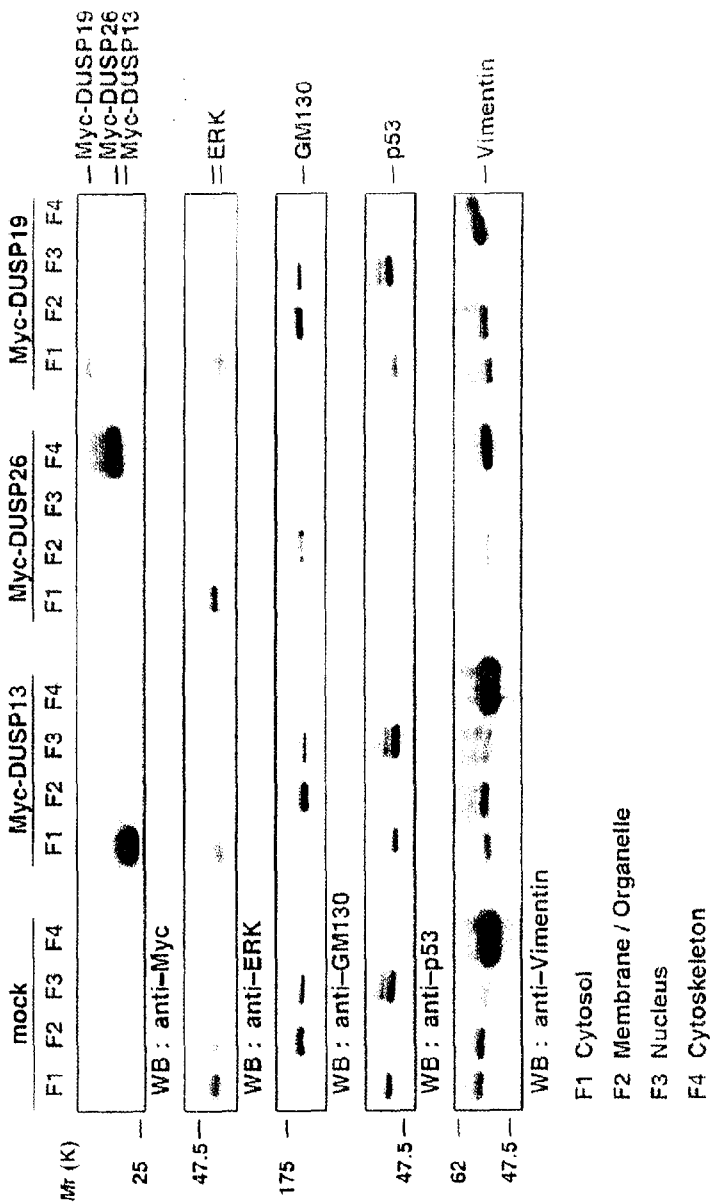
[図3]



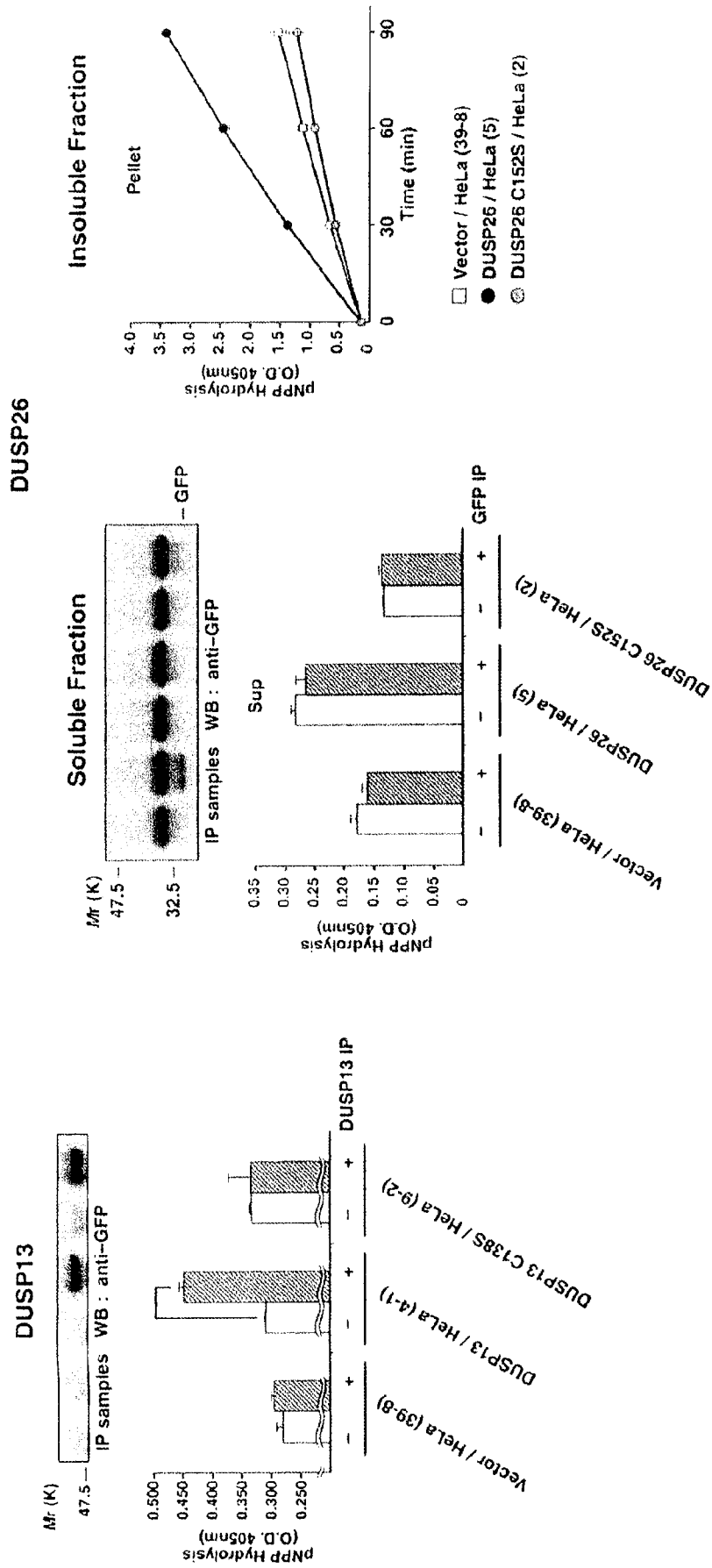
[図4]



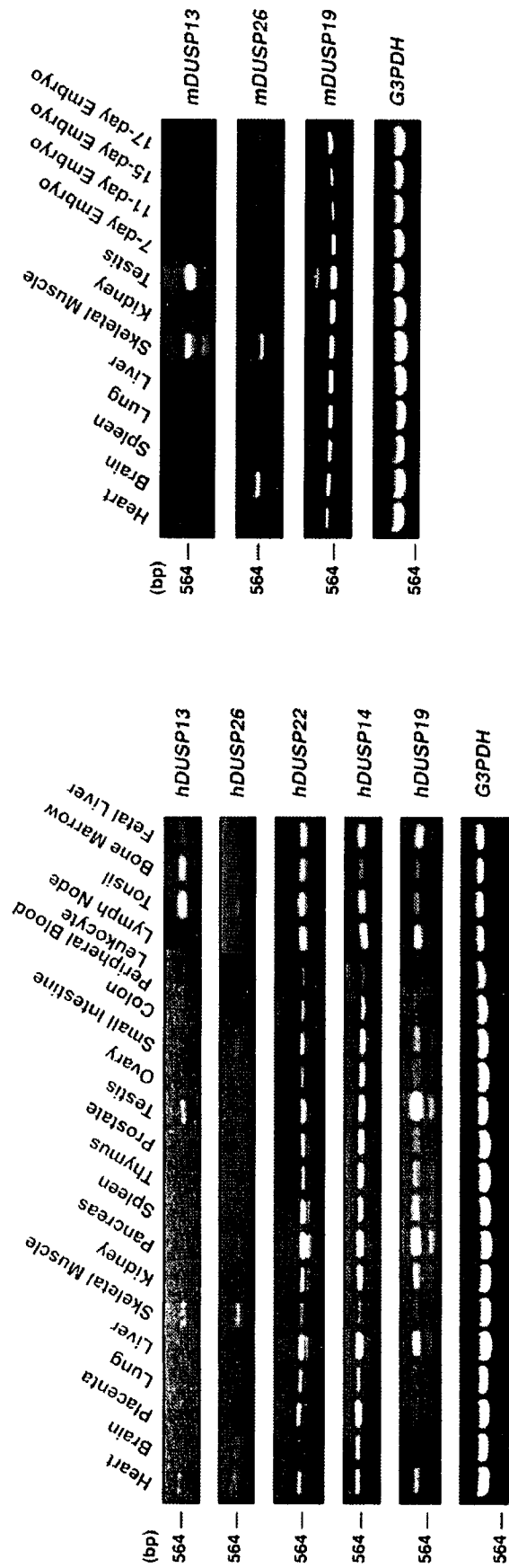
[5]



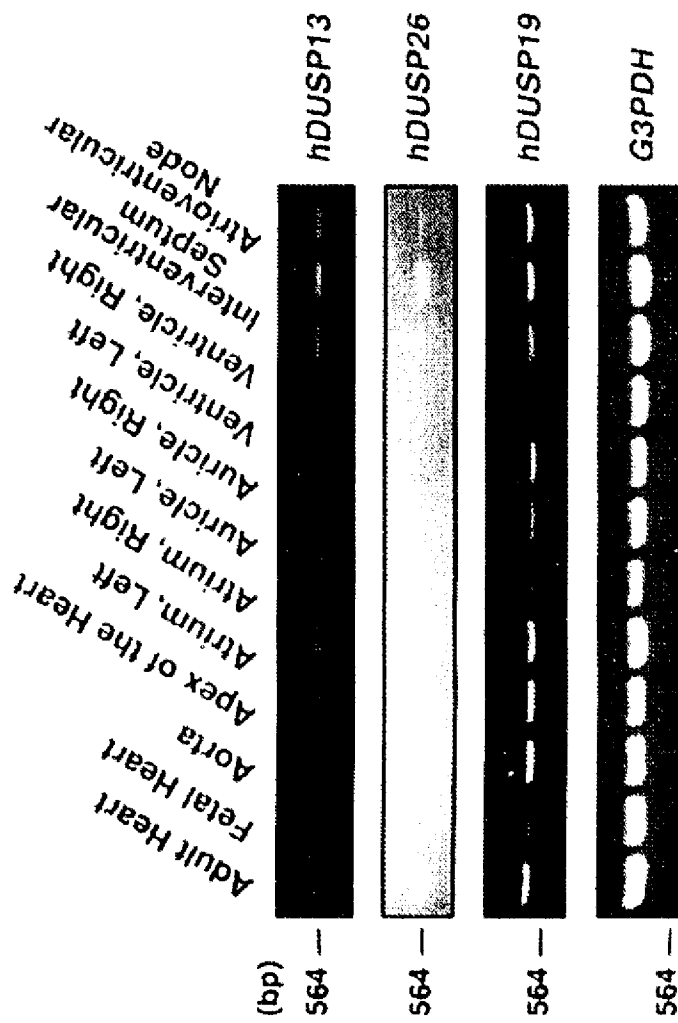
[6]



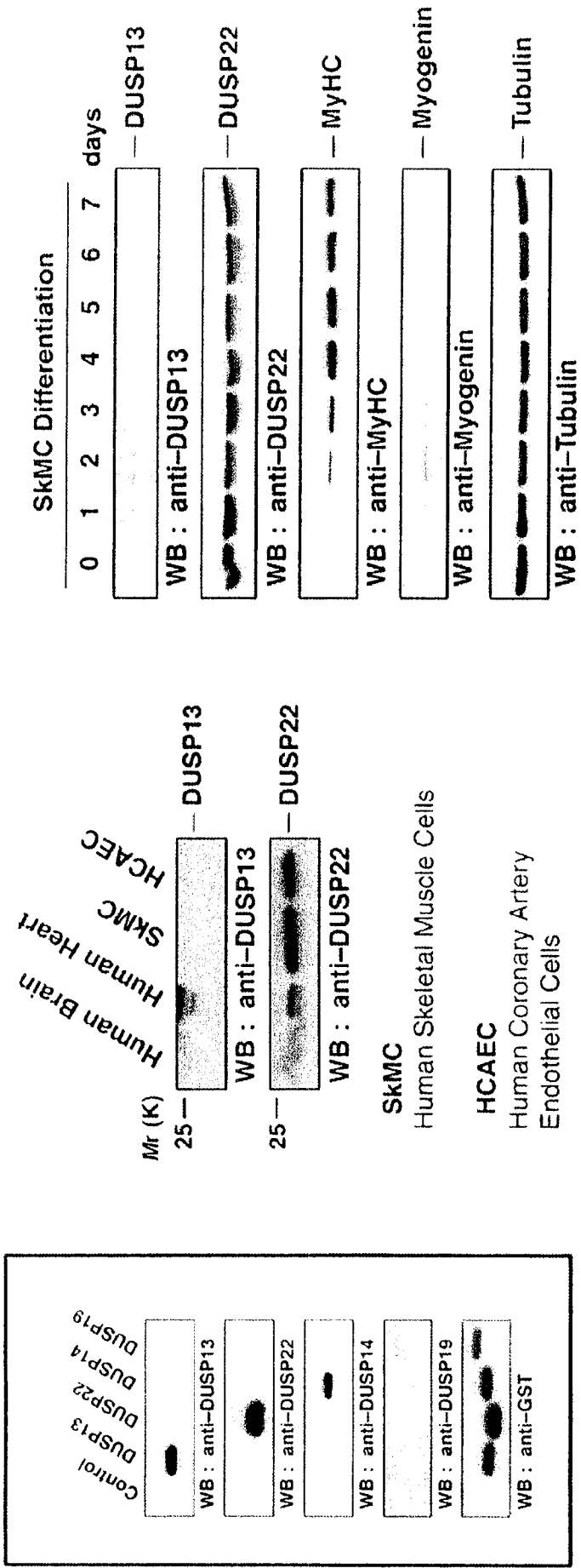
[図7]



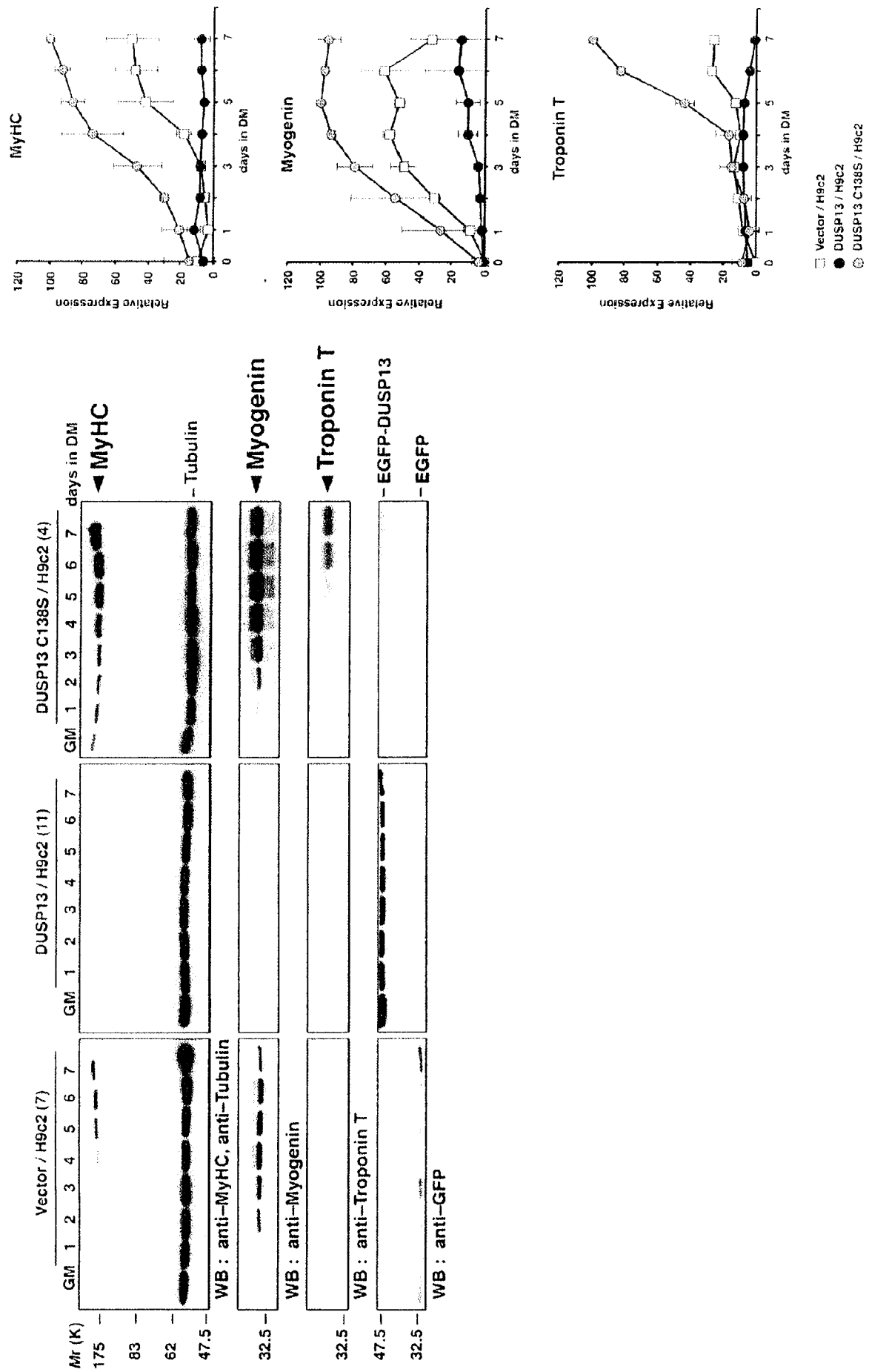
[図8]



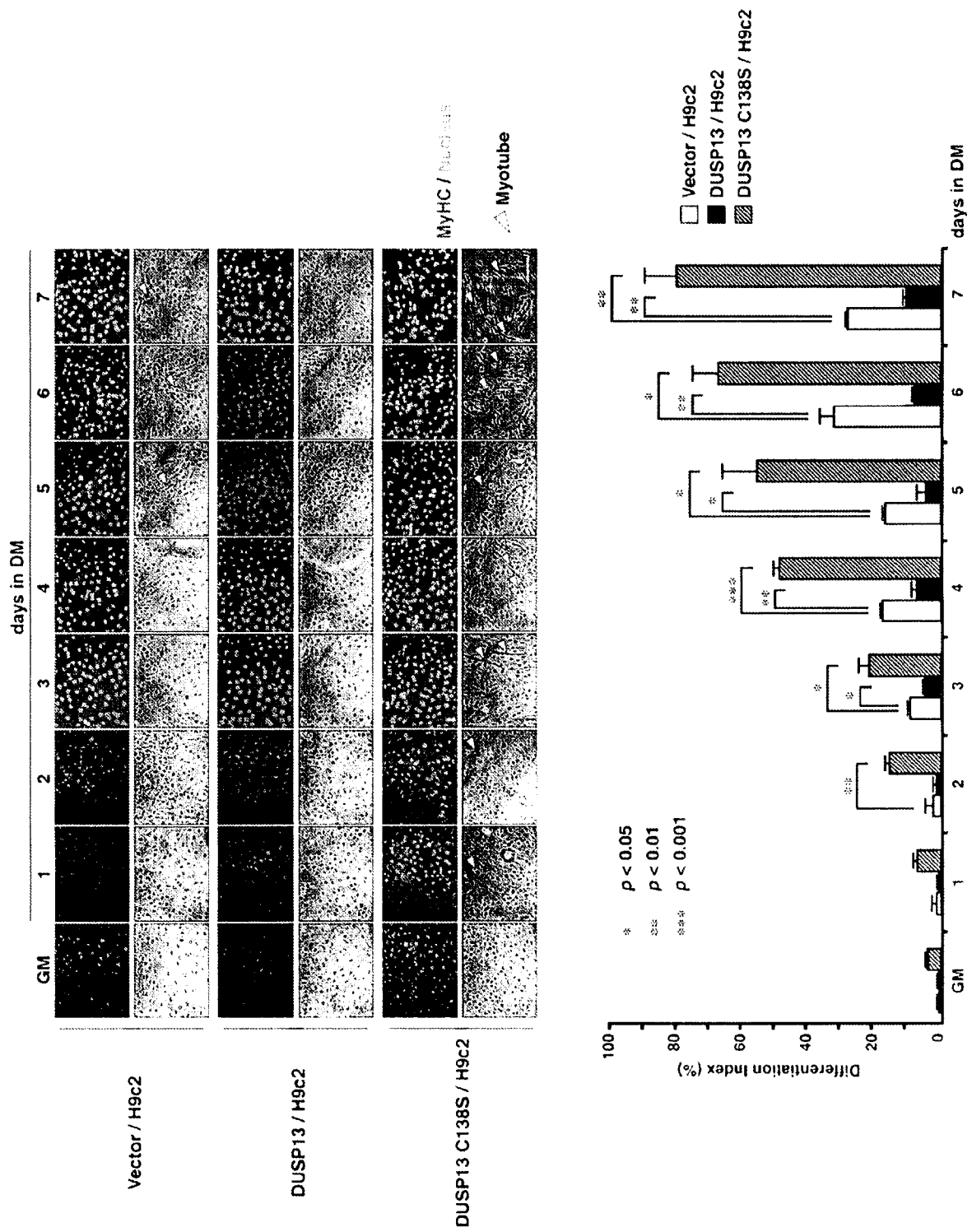
[9]



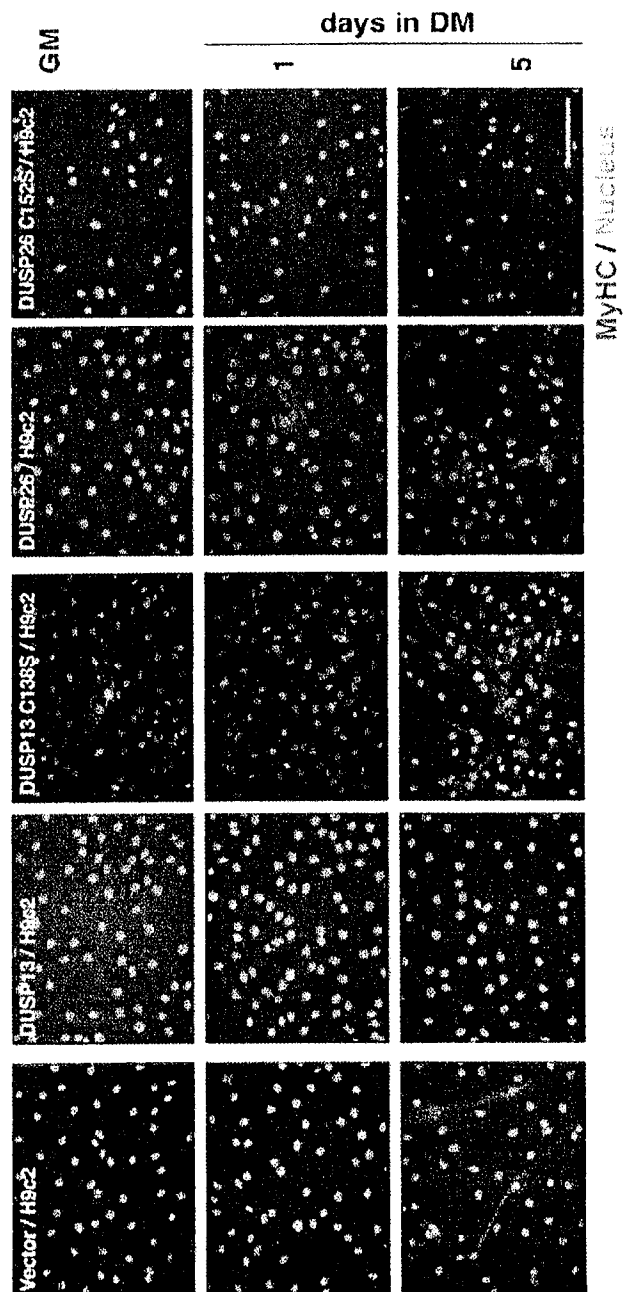
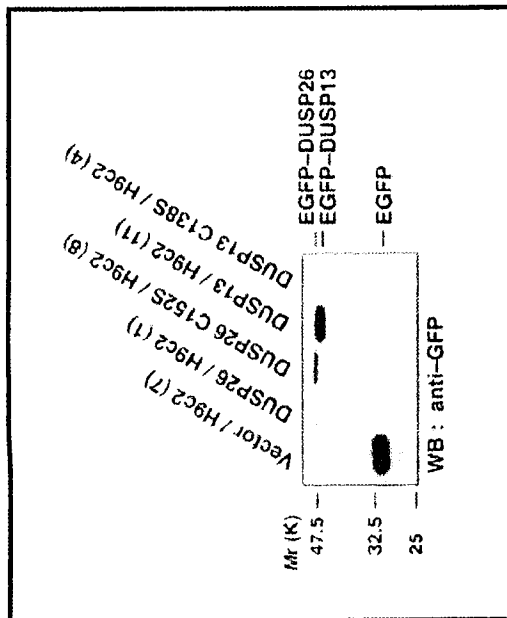
[10]



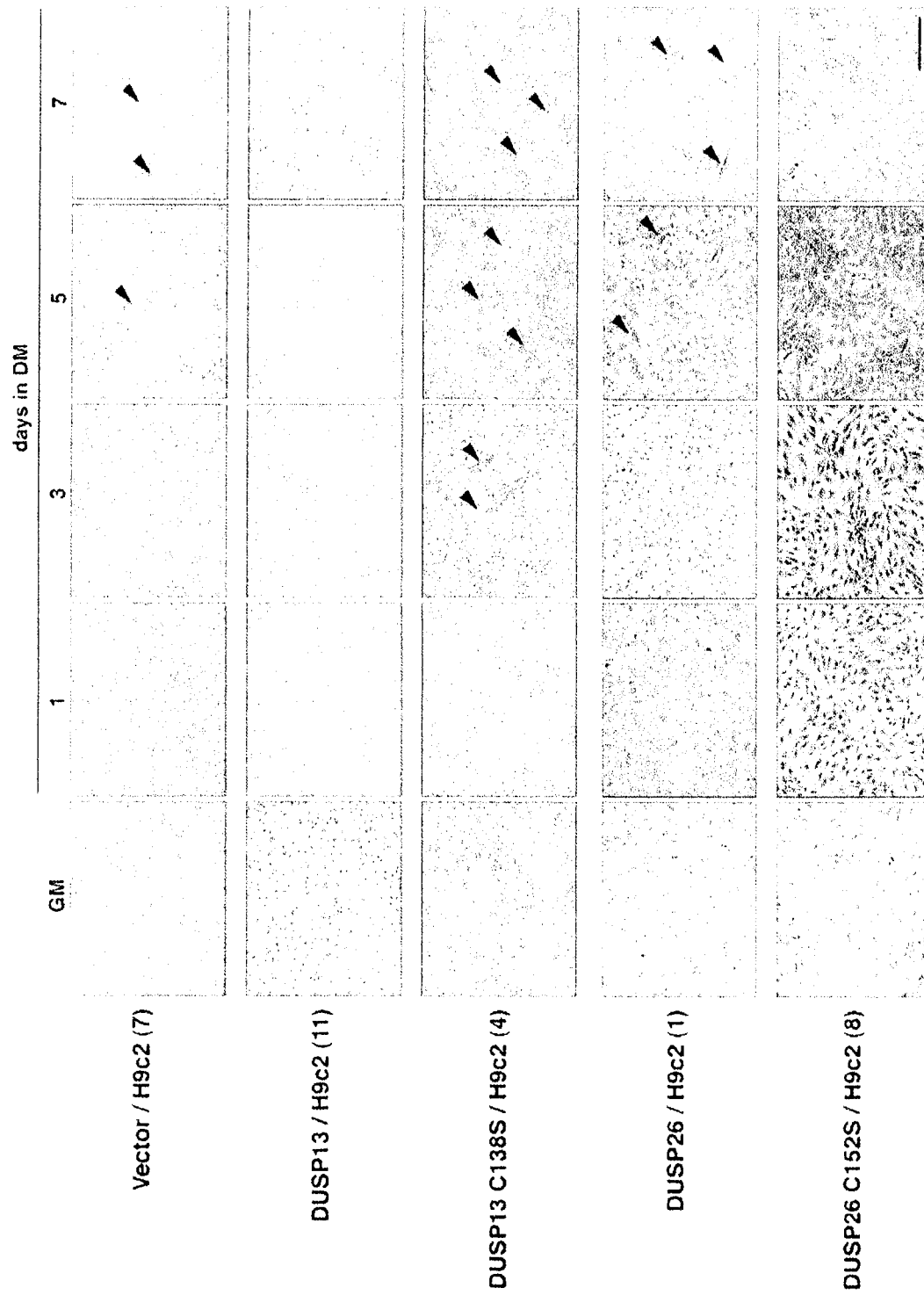
[図11]



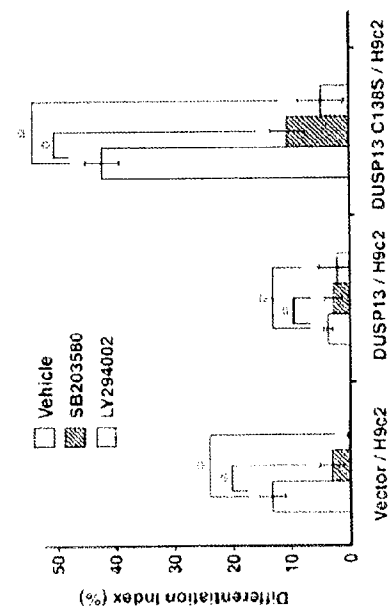
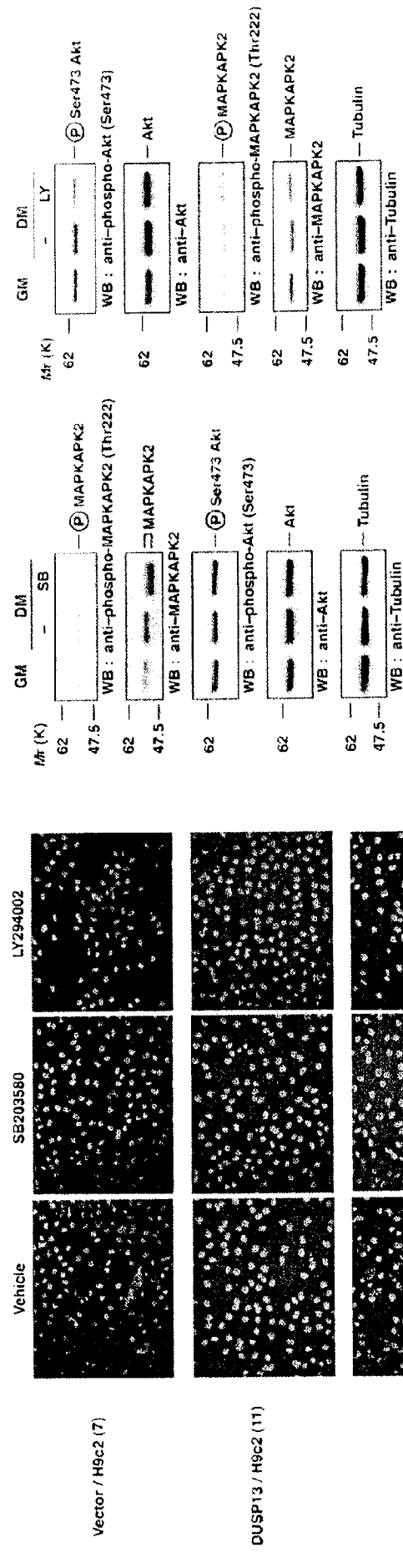
[図12]



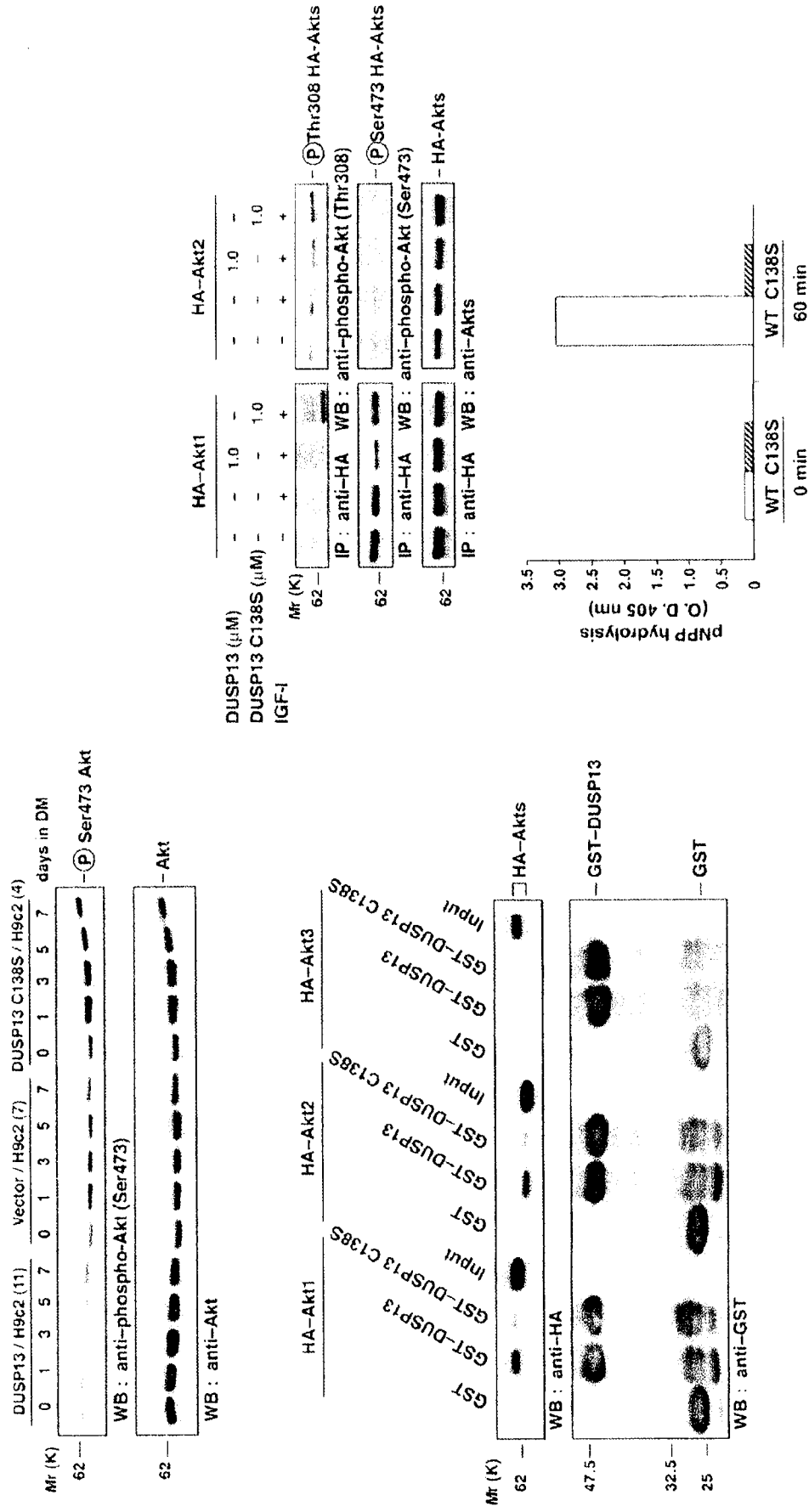
[図13]



[14]



[15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/058079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K38/43(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00, A61K35/76, A61K38/43, A61K48/00, A61P43/00, C07K14/435, C07K16/40, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/16, C12N9/99, C12N15/09, C12P13/04, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/Geneseq,
JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	NCBI, Accession No.AB103375, 10-AUG-2005, [retrieval date 2007.06.22] <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=60735062>	1-18, 25, 26, 29, 30/19-24, 27, 28
X/A	NAKAMURA K. et al., "Molecular cloning and characterization of a novel dual-specificity protein phosphatase possibly involved in spermatogenesis", (1999), Biochem. J., vol.344, Pt3, p.819-825	1-18, 25, 26, 29, 30/19-24, 27, 28
X/A	NCBI, Accession No.AB103376, 10-AUG-2005, [retrieval date 2007.06.22] <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=60735064>	1-18, 25, 26, 29, 30/19-24, 27, 28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 June, 2007 (21.06.07)

Date of mailing of the international search report
03 July, 2007 (03.07.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/058079

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	NCBI, Accession No.Q5FVI9, 10-MAY-2005, [retrieval date : 2007.06.22] <URL:http://www. ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?81888867 :CAGE_DDBJ:1954583>	1-18, 25, 26, 29, 30/19-24, 27, 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/058079

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

*C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i,
C12N9/99(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P13/04(2006.01)i,
C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i*

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/058079

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Referring to claims, the nucleotide sequences and the amino acid sequences corresponding to SEQ ID NOs:1-4 recited in claims 1-6 are already registered in GenBank as accession numbers AB103375, BAD91014, AB103376 and BAD91015, respectively, as mentioned in the description of the present application, and therefore can be considered to be already known at the time of filing the present application. Therefore, the nucleotide sequences and the amino acid sequences are already known at the time of filing the present application. Therefore, DNA molecules or proteins corresponding to these SEQ ID numbers cannot be regarded as having "a special technical feature" in the meaning
(continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/058079

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

within PCT Rule 13.2. Thus, it is considered that the inventions of claims 1-30 involves the following different two inventions.

(1) An invention relating to DNA having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or a protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2; and

(2) An invention relating to DNA having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3 or a protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00, A61K35/76, A61K38/43, A61K48/00, A61P43/00, C07K14/435, C07K16/40, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/16, C12N9/99, C12N15/09, C12P13/04, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq
 JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	NCBI, Accession No. AB103375, 10-AUG-2005, [検索日 2007.06.22] <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=60735062>	1-18, 25, 26, 29, 30/ 19-24, 27, 28
X/ A	NAKAMURA K. et al., "Molecular cloning and characterization of a novel dual-specificity protein phosphatase possibly involved in spermatogenesis", (1999), Biochem. J., vol.344, Pt3, p. 819-825	1-18, 25, 26, 29, 30/ 19-24, 27, 28

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 1 . 0 6 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

0 3 . 0 7 . 2 0 0 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

福岡 信子

4 B

3 5 3 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	NCBI, Accession No. AB103376, 10-AUG-2005, [検索日 2007.06.22] <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=60735064>	1-18, 25, 26, 29, 30/ 19-24, 27, 28
X/ A	NCBI, Accession No. Q5FVI9, 10-MAY-2005, [検索日 : 2007.06.22] <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?81888867 :CAGE_DDBJ:1954583>	1-18, 25, 26, 29, 30/ 19-24, 27, 28

発明の属する分野の分類

C12N15/00(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K38/43(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12N9/99(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P13/04(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲をみると、請求の範囲1－6に記載された配列番号1－4に対応する塩基配列又はアミノ酸配列は、本願明細書中にも記載されているように、それぞれGenBankにアクセッション番号AB103375, BAD91014, AB103376, BAD91015として登録されており、本願出願当時公知であったと認める。そうすると、これらの配列番号に対応するDNA又はタンパク質は、P C T規則13.2における「特別な技術的特徴」が存在するとは認められない。したがって、請求の範囲1～30に記載された発明は、
(1) 配列番号1の塩基配列を有するDNA又は配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質に関連した発明
(2) 配列番号3の塩基配列を有するDNA又は配列番号4のアミノ酸配列を有するタンパク質に関連した発明
別異の2発明が包含されていると認める。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。