

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/038118

発行日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(43) 国際公開日 平成15年5月8日(2003.5.8)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 Q 1/42  
 A O 1 K 67/027  
 A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 K 38/00  
 A 6 1 K 39/395

F I

C 1 2 Q 1/42 Z N A  
 A O 1 K 67/027  
 A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 K 39/395 D  
 A 6 1 K 39/395 N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-540383 (P2003-540383)	(71) 出願人	000005245 藤沢薬品工業株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/011365		大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号
(22) 国際出願日	平成14年10月31日(2002.10.31)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	特願2001-335833 (P2001-335833)	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(32) 優先日	平成13年10月31日(2001.10.31)	(72) 発明者	森田 正彦 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	荒川 弘之 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), JP, US		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスファターゼ阻害因子の評価方法

## (57) 【要約】

フォルスコリンによる CREB の活性化に対して抑制を示すクローンとして O V A R C 1 0 0 0 4 7 3 (配列番号: 1) および N T 2 R M 1 0 0 0 3 7 7 (配列番号: 3) を同定し、該遺伝子、及び/または、該遺伝子によりコードされる蛋白質を用いた評価方法が提供された。更にこれらの蛋白質が、細胞障害の増強作用を有することが見出された。本発明の評価方法に基づいてスクリーニングすることができる化合物は、CREB の脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害の増強に対する抑制剤、並びに記憶障害および/または神経変性疾患の予防剤や治療剤として有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の工程を含む、被験化合物の、CREBの脱リン酸化反応を阻害する活性の検出方法。

(1) CREBのリン酸化が可能な条件下で、またはリン酸化されたCREB若しくはそのリン酸化部位を含むペプチドの存在下で、以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質に被験化合物を接触させる工程、および

(a) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(2) CREBまたはそのリン酸化部位を含むペプチドのリン酸化のレベルを測定する工程

## 【請求項 2】

CREBのリン酸化のレベルを、CREBにより制御される遺伝子の転写活性を指標として測定する請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

以下の工程を含む、CREBの脱リン酸化反応を阻害する活性を有する化合物の評価方法。

(1) 請求項1に記載の方法によって被験化合物のCREBの脱リン酸化反応を阻害する活性を検出する工程、および

(2) 被験化合物不存在下でのCREBのリン酸化レベルと比較して、リン酸化レベルが高い被験化合物を選択する工程

## 【請求項 4】

以下の要素を含む、被験化合物のCREBの脱リン酸化反応を阻害する活性の検出用キット。

(1) 以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質、および

(a) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(2) CREBのリン酸化のレベルを測定するための手段

## 【請求項 5】

請求項3に記載の方法によって選択される化合物を有効成分として含有するCREBの脱リン酸化反応の阻害剤。

## 【請求項 6】

請求項3に記載の方法によって選択される化合物を有効成分として含有する記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

## 【請求項 7】

以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質の発現を調節したトランスジェニック非

ヒト動物からなる、CREBのリン酸化状態が調節されたモデル動物。

- (a) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質
- (b) 配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- (c) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- (d) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

10

【請求項8】

以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質とCREBとを接触させる工程を含む、CREBの脱リン酸化方法。

- (a) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質
- (b) 配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- (c) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- (d) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

20

【請求項9】

以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質を主成分として含むCREBの脱リン酸化剤。

- (a) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質
- (b) 配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- (c) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- (d) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

30

【請求項10】

配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を持つ蛋白質、または該蛋白質をコードする遺伝子を含有するCREBの脱リン酸化反応の阻害剤。

40

【請求項11】

配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を持つ蛋白質、または該蛋白質をコードする遺伝子を含有する記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

【請求項12】

配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列に対して相補的な配列を有し、配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現を阻害するアンチセンス核酸を含有するCREBの脱リン酸化反応の阻害剤。

50

## 【請求項 13】

配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列に対して相補的な配列を有し、配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現を阻害するアンチセンス核酸を含有する記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

## 【請求項 14】

以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質に対する抗体を主成分として含むC R E Bの脱リン酸化反応の阻害剤。

(a)配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b)配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質 10

(c)配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d)配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

## 【請求項 15】

以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質に対する抗体を主成分として含む記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

(a)配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質 20

(b)配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c)配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d)配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

## 【請求項 16】

以下の工程を含む、被験化合物の、細胞障害作用の調節活性の検出方法。 30

(1)以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質を発現する細胞に、細胞を障害する条件下で、被験化合物を接触させる工程、および

(a)配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b)配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c)配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d)配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質 40

(2)前記細胞の細胞障害のレベルを対照と比較する工程、および

(3)対照との細胞障害のレベルの差を、被験化合物の細胞障害作用の調節活性と関連付ける工程

## 【請求項 17】

細胞を障害する条件が、細胞障害作用を有する化合物の投与によって与えられる請求項16に記載の方法。

## 【請求項 18】

細胞障害作用を有する化合物がアポトーシス誘導剤である請求項17に記載の方法。

## 【請求項 19】

アポトーシス誘導剤が、小胞体カルシウムポンプ阻害剤である請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

対照と比較して細胞障害レベルが低い場合に、被験化合物の細胞障害作用の抑制活性が検出される請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

以下の工程を含む、細胞障害作用の調節活性を有する化合物の選択方法。

(1) 請求項 16 に記載の方法によって被験化合物の細胞障害作用の調節活性を検出する工程、および

(2) 対照と比較して、細胞障害レベルに差がある被験化合物を選択する工程

【請求項 22】

対照と比較して細胞障害レベルが小さい被験化合物を選択する工程を含む請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 3 に記載の方法によって選択された化合物を被験化合物とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 21 に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含有する、細胞障害作用の調節剤。

【請求項 25】

細胞が神経細胞である、請求項 24 に記載の、細胞障害作用の調節剤。

【請求項 26】

請求項 22 に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含有する、細胞障害作用の抑制剤。

【請求項 27】

細胞が神経細胞である、請求項 26 に記載の、細胞障害の抑制剤。

【請求項 28】

請求項 22 に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含有する、記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

【請求項 29】

以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の蛋白質、またはそれをコードするポリヌクレオチドを有効成分とする、細胞障害作用を有する成分の作用増強剤。

(a) 配列番号：2 または配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号：1 または配列番号：3 に記載の塩基配列からなる 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 によってコードされる (a) に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c) 配列番号：2 または配列番号：4 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a) に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：2 または配列番号：4 に記載のアミノ酸配列と 90% 以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a) に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

【請求項 30】

細胞障害作用を有する成分がアポトーシス誘導剤である請求項 29 に記載の作用増強剤。

【請求項 31】

アポトーシス誘導剤が抗腫瘍剤である請求項 30 に記載の作用増強剤。

【請求項 32】

以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の蛋白質、またはそれをコードするポリヌクレオチドを投与する工程を含む、細胞障害作用を有する成分の作用増強方法。

(a) 配列番号：2 または配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号：1 または配列番号：3 に記載の塩基配列からなる 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 によってコードされる (a) に記載の蛋白質と

10

20

30

40

50

機能的に同等な蛋白質

(c) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

【請求項33】

次の成分を含む、細胞障害組成物。

(1) 以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質、またはそれをコードするポリヌクレオチド、および

(a) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(2) 細胞障害作用を有する成分

【請求項34】

細胞が腫瘍細胞である、請求項33に記載の細胞障害組成物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、サイクリックAMP(cAMP)応答配列(CRE)に結合する転写因子(CREB; cAMP responsive element binding protein)の転写活性を阻害するホスファターゼを用いたホスファターゼ阻害因子の評価方法に関する。該方法を用いて得られるホスファターゼ阻害因子は、CREBの転写活性を上昇させ、記憶障害や神経変性を改善すると考えられ、幅広い神経疾患に対する医薬となることが期待される。

背景技術

CREBは、CREに結合する転写因子である。サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼによって、CREBのSer133がリン酸化され活性化する。CREは、cAMPにより発現の促進される遺伝子群(ソマトスタチン、c-fos等)の転写制御部位の中でcAMPによる誘導に不可欠な部分である。

セリンがリン酸化されたCREBは、CREB結合蛋白質(CBP; CREB binding protein)を中心とした転写制御因子と結合し、結合活性が上昇する(Shaywitz, A. J. et al., Annu. Rev. Biochem. 68: 821 (1999年))。また、高濃度のK<sup>+</sup>による脱分極(Beitner-Johnson, D. et al., J. Biol. Chem. 273: 19834-19839 (1998年))、または、長期増強(LTP; long-term potentiation)によるシナプス刺激(Deisseroth, K. et al., Neuron 16: 89-101 (1996年))によって、CREBの転写活性の上昇が観察される。さらに、神経細胞におけるグルタミン酸によるカルシウムシグナルが、シナプス活性によって誘導されるCREBの転写活性を上昇させることも知られている(Hardingham, G. E. et al., Nat. Neurosci. 4: 261-267 (2001年))。そして、アメフラシやラットの行動記憶の実験結果より、CREBのリン酸化が記憶形成に重要であることが公知である(Silva, A. J. et al., Annu. Rev. Neurosci. 21: 127 (1998年))。また、アルツハイマー型痴呆では、脳内のリン酸化CREBの量が有意に減少している(Yamamoto

10

20

30

40

50

- Sasaki, M. et al., Brain Res. 824: 300-303 (1999年)。以上のことより、CREB活性の上昇が記憶形成と関連していることが示唆されている。

さらに最近では、CREB活性の上昇が神経細胞の抗アポトーシス活性と結びついていることが示されている。脳梗塞(Tanaka, K. et al., Brain Res. 818: 520-526 (1999年)等)の病態モデルにおいて、梗塞近傍のペナンプラ(penumbra)領域においてCREBのリン酸化領域が観察される。ペナンプラ領域は、脳梗塞病変の周囲の、血流は低下しているが神経活動が継続している領域を指す用語である。一般に、ペナンプラ領域における血流が不十分な状態が48時間以上継続すると、神経細胞死が観察されるようになる。この事実は、細胞レベルの実験系においても観察されており、神経培養細胞において低酸素(Beitmer-Johnson, D. et al., 上述)、および低グルコース刺激(Ricco, A. et al., Science 286: 2358-2361 (1999年))によるCREBの転写活性の上昇が認められている。また、栄養因子除去による神経細胞死に対する、CREBの転写上昇による生存効果が認められている(Ricco, A. et al., 上述)。

一方CBPは、CREBのコアクチベーターとして作用する。CBPは、リン酸化CREBおよび基本転写因子TFIIBの両者に結合し、CREBによる転写活性を促進することが知られている(Shaywitz, A. J. et al., 上述)。ハンチントン病の原因遺伝子であるIT15遺伝子の産物huntingtin、および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮病の原因遺伝子の産物であるatrophin-1はCBPと活発に結合し、その機能を抑制する(Nucifora Jr., F. C. et al., Science 291: 2423-2428 (2001年))。即ち、huntingtinおよびatrophin-1により、CBPを介してのCREBの転写活性が抑制され、ニューロンの生存に決定的であると知られている標的遺伝子の転写が防止されることにより神経細胞が障害を受けることが知られている。

一般に、種々の細胞内の事象がプロテインキナーゼおよびホスファターゼによるリン酸化(または脱リン酸化)を介して調節されていることが知られている。たとえば、収縮、膜輸送、グリコーゲン代謝、および細胞分裂等のリン酸化による調節機構が明らかにされている。CBPがリン酸化されたCREBに結合して転写活性を促進することから、CREBによる転写活性にもホスファターゼ関連遺伝子が関与していることが考えられた。ホスファターゼ関連遺伝子がCREBの脱リン酸化に働き、その転写活性が抑制されることが十分に考えられ、記憶および神経変性に対してCREBの転写活性の上昇が改善効果を持つことが示唆される。

ところで、cAMP刺激によるCREB活性の主要なダウンレギュレーターとしては、典型的なSer/ThrホスファターゼであるProtein Phosphatase-1(PP-1)が知られている(Hagiwara, M. et al., Cell 70: 105-113 (1992年))。PP-1の活性は、リン酸化されたInhibitor-1(I-1)により阻害されることが報告された(Cohen, P., Annu. Rev. Biochem. 58: 453-508 (1989年))。この報告により、細胞におけるcAMP応答が、CREBの脱リン酸化の阻止によって増幅され得ることが示唆された。しかしcAMP刺激によるCREB活性のダウンレギュレーターとして働くホスファターゼは、現在のところPP-1の他には知られていない。

#### 発明の開示

本発明の課題は、CREBによる転写活性を抑制するホスファターゼを同定し、該ホスファターゼの活性を調節する化合物の評価方法を提供することである。CREBによる転写活性を抑制するホスファターゼの活性を阻害する化合物は、CREBの転写活性の上昇を通じて、記憶障害あるいは神経変性を改善し、幅広い神経疾患に対する治療効果を期待できる。

また本発明は、細胞障害を増強する蛋白質を同定し、当該蛋白質の活性を調節する化合物の評価方法の提供を課題とする。細胞の障害を増強する活性の調節によって、各種の細胞

障害に起因する様々な疾患の治療や予防を実現できる。

本発明者らは、CREB転写活性を阻害するホスファターゼを同定するため、様々なcDNAライブラリーを探索し、バイオインフォーマティクスを使ってホスファターゼ関連遺伝子を選択した。更に選択された候補遺伝子について、フォルスコリンによるCREB転写活性の上昇を抑制する作用を確認した。その結果、ホスファターゼ活性を有する蛋白質をコードする2つの遺伝子を同定した。そしてこれらの遺伝子によってコードされる蛋白質を用いて、ホスファターゼの活性を調節する化合物の評価が実現できることを見出し、本発明を完成した。更に本発明者らは、新たにホスファターゼ活性を有することが見出された蛋白質が、細胞障害を増強することを明らかにした。そして当該蛋白質を用いて、細胞障害の増強作用を調節する活性を評価できることを見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の評価方法、あるいは本発明者らによって見出されたホスファターゼ活性あるいは細胞障害の増強活性の用途に関する。

10

〔1〕以下の工程を含む、被験化合物の、CREBの脱リン酸化反応を阻害する活性の検出方法。

(1) CREBのリン酸化が可能な条件下で、またはリン酸化されたCREB若しくはそのリン酸化部位を含むペプチドの存在下で、以下の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質に被験化合物を接触させる工程、および

(a) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

20

(c) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(2) CREBまたはそのリン酸化部位を含むペプチドのリン酸化のレベルを測定する工程

〔2〕CREBのリン酸化のレベルを、CREBにより制御される遺伝子の転写活性を指標として測定する〔1〕に記載の方法。

30

〔3〕以下の工程を含む、CREBの脱リン酸化反応を阻害する活性を有する化合物の評価方法。

(1) 〔1〕に記載の方法によって被験化合物のCREBの脱リン酸化反応を阻害する活性を検出する工程、および

(2) 被験化合物不存在下でのCREBのリン酸化レベルと比較して、リン酸化レベルが高い被験化合物を選択する工程

〔4〕以下の要素を含む、被験化合物のCREBの脱リン酸化反応を阻害する活性の検出用キット。

(1) 前記(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質、および

(2) CREBのリン酸化のレベルを測定するための手段

40

〔5〕〔3〕に記載の方法によって選択される化合物を有効成分として含有するCREBの脱リン酸化反応の阻害剤。

〔6〕〔3〕に記載の方法によって選択される化合物を有効成分として含有する記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

〔7〕前記(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質の発現を調節したトランスジェニック非ヒト動物からなる、CREBのリン酸化状態が調節されたモデル動物。

〔8〕前記(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質とCREBとを接触させる工程を含む、CREBの脱リン酸化方法。

〔9〕前記(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質を主成分として含むCREBの脱リン酸化剤。

50



〔10〕配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を持つ蛋白質、または該蛋白質をコードする遺伝子を含有するCREBの脱リン酸化反応の阻害剤。

〔11〕配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を持つ蛋白質、または該蛋白質をコードする遺伝子を含有する記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

10

〔12〕配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列に対して相補的な配列を有し、配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現を阻害するアンチセンス核酸を含有するCREBの脱リン酸化反応の阻害剤。

〔13〕配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列に対して相補的な配列を有し、配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現を阻害するアンチセンス核酸を含有する記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

〔14〕前記(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質に対する抗体を主成分として含むCREBの脱リン酸化反応の阻害剤。

〔15〕前記(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質に対する抗体を主成分として含む記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

20

〔16〕以下の工程を含む、被験化合物の、細胞障害作用の調節活性の検出方法。

(1)前記(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質を発現する細胞に、細胞を障害する条件下で、被験化合物を接触させる工程、および

(2)前記細胞の細胞障害のレベルを対照と比較する工程、および

(3)対照との細胞障害のレベルの差を、被験化合物の細胞障害作用の調節活性と関連付ける工程

〔17〕細胞を障害する条件が、細胞障害作用を有する化合物の投与によって与えられる〔16〕に記載の方法。

〔18〕細胞障害作用を有する化合物がアポトーシス誘導剤である〔17〕に記載の方法。

30

〔19〕アポトーシス誘導剤が、小胞体カルシウムポンプ阻害剤である〔18〕に記載の方法。

〔20〕対照と比較して細胞障害レベルが低い場合に、被験化合物の細胞障害作用の抑制活性が検出される〔16〕に記載の方法。

〔21〕以下の工程を含む、細胞障害作用の調節活性を有する化合物の選択方法。

(1)〔16〕に記載の方法によって被験化合物の細胞障害作用の調節活性を検出する工程、および

(2)対照と比較して、細胞障害レベルに差がある被験化合物を選択する工程

〔22〕対照と比較して細胞障害レベルが小さい被験化合物を選択する工程を含む〔21〕に記載の方法。

40

〔23〕〔3〕に記載の方法によって選択された化合物を被験化合物とする〔22〕に記載の方法。

〔24〕〔21〕に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含有する、細胞障害作用の調節剤。

〔25〕細胞が神経細胞である、〔24〕に記載の、細胞障害の調節剤。

〔26〕〔22〕に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含有する、細胞障害作用の抑制剤。

〔27〕細胞が神経細胞である、〔26〕に記載の、細胞障害の抑制剤。

〔28〕〔22〕に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含有する、記憶障害および/または神経変性疾患治療剤。

50

〔29〕前記(a)～(d)のいずれかに記載の蛋白質、またはそれをコードするポリヌクレオチドを有効成分とする、細胞障害作用を有する成分の作用増強剤。

〔30〕細胞障害作用を有する成分がアポトーシス誘導剤である〔29〕に記載の作用増強剤。

〔31〕アポトーシス誘導剤が抗腫瘍剤である〔30〕に記載の作用増強剤。

〔32〕前記(a)～(d)のいずれかに記載の蛋白質、またはそれをコードするポリヌクレオチドを投与する工程を含む、細胞障害作用を有する成分の作用増強方法。

〔33〕次の成分を含む、細胞障害組成物。

(1)前記(a)～(d)のいずれかに記載の蛋白質、またはそれをコードするポリヌクレオチド、および

(2)細胞障害作用を有する成分

〔34〕細胞が腫瘍細胞である、〔33〕に記載の細胞障害組成物。

本発明は、次の2つの遺伝子によってコードされるホスファターゼまたはこれらのホスファターゼと機能的に同等な蛋白質の活性を阻害する活性の検出方法、およびそれを利用した評価方法である。あるいは本発明は、次の2つの遺伝子によってコードされる蛋白質あるいはその機能的に同等な蛋白質が有する細胞障害の増強作用を調節する活性の検出方法、およびそれを利用したスクリーニング方法である。

塩基配列 アミノ酸配列

OVARC1000473 配列番号:1 配列番号:2

NT2RM1000377 配列番号:3 配列番号:4

上記2つの遺伝子は、いずれもヘリックス研究所の全長cDNAデータベース(EP1074617)より見出された。これらの遺伝子は全長cDNAとしてその構造は公知であるが、CREBに対するホスファターゼ活性を有することは知られていない。

OVARC1000473(GenBank BC004176)は卵巣より単離された遺伝子である。この遺伝子によってコードされる218の全アミノ酸残基中、C末端のアミノ酸(122-218)が二特異性プロテインホスファターゼ(dual specificity phosphatase; Swissplot Q16690)と34%の相同性を有し、159-176のアミノ酸配列にホスファターゼの触媒部位(Keyse S M. Biochem. Biophys. Acta(1995 Mar 16)1265(2-3):152-60)が認められた(図1上)。

また、NT2RM1000377(GeneBank AK022513)はヒト神経芽細胞NT2細胞より単離された遺伝子である。この遺伝子によってコードされるアミノ酸配列(140アミノ酸残基)は、二特異性プロテインホスファターゼMKP-5(GenBank AB026436)のC末側343-482アミノ酸残基と一致し、67-78のアミノ酸配列にホスファターゼの触媒部位を有していた(図1下)。更にそのアミノ酸配列には、Cdc25とアミノ酸1次配列で高いホモロジーを示す領域が見られた。当該領域をCdc25様ドメインとして図1(下)に示した。CDC25A(cell division cycle 25A, M-phase inducer phosphatase 1)は、細胞周期の進行に必須な機能を担っているtyrosine protein phosphataseの一種で、CDC2蛋白を脱リン酸化して、そのキナーゼ活性を上昇させることが知られている。MKP-5の塩基配列を配列番号:5に、またこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号:6に示した。これらの遺伝子はdual specificity phosphatase 10(DUSP10)としてもデータベースに登録されている(GenBank NM\_144729, GenBank NM\_144728)。

これらの遺伝子は、次のようにして同定された。まずヘリックス研究所のcDNAデータベースからBLASTアルゴリズムにより、ホスファターゼ関連遺伝子を選び出した。次に、選ばれた遺伝子候補遺伝子をCREレポーター遺伝子と共にPC12細胞に導入した。この細胞にフォルスコリンを作用させ、CREBの転写活性を誘導した。その結果、フォルスコリンによるCREBの転写活性の増加を抑制する作用を持つ遺伝子として、前記

10

20

30

40

50

2つのクローンを同定した。

そして当該蛋白質を標的分子として用いることにより、CREBの脱リン酸化を抑制する活性を評価できることが見出された。すなわち本発明は、以下の工程を含む、被験化合物の、CREBの脱リン酸化反応を阻害する活性の検出方法に関する。

(1) CREBのリン酸化が可能な条件下で、またはリン酸化されたCREB若しくはそのリン酸化部位を含むペプチドの存在下で、上記(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質に被験化合物を接触させる工程、および

(2) CREBまたはそのリン酸化部位を含むペプチドのリン酸化のレベルを測定する工程

本発明によるCREBの脱リン酸化反応を阻害する活性の検出方法は、上述の蛋白質または前記蛋白質と機能的に同等な蛋白質を用いて次のようにして行われる。すなわち、CREBのリン酸化が可能な条件下で、またはリン酸化されたCREB若しくはそのリン酸化部位を含むペプチドの存在下で、前記蛋白質または前記蛋白質と機能的に同等な蛋白質、および被験化合物を接触させ、CREBおよび/またはリン酸化部位を含むペプチドのリン酸化のレベルを測定する。このような測定は、*in vivo*または*in vitro*において行うことができる。

本発明に用いるCREBによる転写活性を抑制するホスファターゼは、配列番号：2、または配列番号：4で示される配列の全部またはその一部の配列を有する蛋白質、あるいは該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である。

ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質がフォルスコリンにより誘導されたCREBの転写活性の増加を抑制する活性、または、CREBを脱リン酸化する活性を持つことを意味する。即ち、本発明の「機能的に同等な蛋白質」には、脱リン酸化反応を触媒するような断片も含まれる。このような活性はCREBのリン酸化が可能な条件下で、当該蛋白質をCREBと接触させ、CREBのリン酸化レベルの減少を指標として確認することができる。

例えば、CREBおよびcAMP存在下で該蛋白質がCREレポーター遺伝子の発現を抑制すれば、その蛋白質は機能的に同等な蛋白質と言うことができる。具体的には、以下のような方法によって目的蛋白質のCREBの転写活性化を抑制する活性を決定することができる。

- 1) 目的蛋白質をコードする遺伝子を発現するベクターを調製する、
- 2) 発現ベクターをCREレポーター遺伝子と共に細胞内へ導入する、
- 3) フォルスコリンを添加する、そして
- 4) CREレポーター遺伝子の発現を確認する。

更に本発明においてフォスファターゼ活性が見出された上記蛋白質は、フォスファターゼ活性のみならず、細胞障害を増強する活性を有することが明らかにされた。そして当該蛋白質を標的分子として用いることにより、細胞障害作用の増強を調節する活性を評価できることが見出された。すなわち本発明は、次の工程を含む細胞障害作用の増強を調節する活性の検出方法を提供する。

(1) 上記の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質を発現する細胞に、細胞を障害する条件下で、被験化合物を接触させる工程、および

(2) 前記細胞の細胞障害のレベルを対照と比較する工程、および

(3) 対照との細胞障害のレベルの差を、被験化合物の細胞障害作用の調節活性と関連付ける工程

本発明によって明らかにされたフォスファターゼ関連遺伝子であるNT2RM1000377は、細胞障害作用を増強する活性を有する。したがって、上記のような方法によって、その活性を調節する作用を見出すことができる。より具体的には、対照と比較して細胞障害レベルが低い場合に、細胞障害作用の増強作用を抑制する活性が検出される。逆に、対照と比較して細胞の障害レベルが高い場合には、細胞障害作用の増強を刺激する活性が検出される。

本発明において、細胞を障害する条件とは、細胞の増殖や生存を妨げる条件を言う。この

ような条件は、たとえば細胞のアポトーシスを誘導することによって与えることができる。具体的には、細胞障害作用を有する化合物の投与、細胞のアポトーシスを誘導する培養条件の変化などを、細胞を障害する条件として利用することができる。細胞を障害する作用を有する化合物には、アポトーシス誘導剤を用いることができる。細胞にアポトーシスを誘導する様々な化合物が知られている。具体的には、fasリガンドや小胞体カルシウムポンプ阻害剤は、細胞にアポトーシスを誘導する作用を有する。細胞を障害する化合物を細胞に投与するタイミングは任意である。すなわち、被験化合物を細胞に接触させる前、同時、または後に細胞を障害する化合物を投与することができる。

この他、血清などの培地成分を要求する細胞に対して、血清を枯渇させることにより、アポトーシスを誘導することも公知である。培養条件の変化によるアポトーシスの誘導のタイミングも、任意である。すなわち被験化合物の投与の前、同時、あるいは後に、アポトーシスを誘導するための培養条件の変化を与えることができる。被験化合物を与える前にアポトーシスを誘導した場合には、たとえば被験化合物の細胞障害増強に対する治療効果を評価することができる。逆に、被験化合物を与えた後にアポトーシスを誘導すると、主として被験化合物の細胞障害増強に対する予防的効果を知ることができる。

本発明の方法において用いることができる細胞として、神経細胞様の形質を示す細胞を示すことができる。本発明において標的分子として用いられる蛋白質は、いずれもCREBの脱リン酸化に関与している。CREBが記憶形成や神経細胞の障害と強く関連していることは既に述べた。したがって、その作用に与える影響を評価するためには、神経細胞様の形質を示す細胞を用いるのが望ましい。神経細胞様の形質を示す細胞として、PC12 20  
を示すことができる。PC12は、ラット(*Rattus norvegicus*)の副腎褐色細胞腫(*pheochromocytoma; adrenal gland*)から樹立された細胞株で、レチノイン酸やNGF等の刺激によって、ニューロン様の細胞に分化させることができる。PC12(ATCC CRL-1721)はセルバンクから入手することができる。

本発明の方法において、対照としては被験化合物を投与しない細胞を用いることができる。また、被験化合物の活性をより正確に評価するために、細胞を障害する条件を与えない実験も合わせて実施することができる。このような実験を組み合わせることにより、被験化合物そのものが細胞に与える影響を合わせて評価することができる。すなわち、細胞を障害する条件の有無に関わらず細胞の障害が観察されるときには、被験化合物そのものが細胞障害作用を有していると考えられる。 30

細胞の障害レベルを測定する方法は公知である。具体的には、細胞の増殖レベル、アポトーシスを起こした細胞のレベル、あるいは破壊された細胞のレベルなどを指標として、細胞の障害レベルを知ることができる。

本発明によって明らかにされたフォスファターゼ関連遺伝子であるNT2RM1000377が、小胞体カルシウムポンプ阻害剤による細胞障害作用を増強することが確認された。細胞障害作用とは、細胞の生存妨げられることを言う。たとえば、アポトーシスの誘導は細胞障害に含まれる。また『細胞障害の増強』とは、上述の方法により各細胞の障害レベルを測定した場合に、ある単独の要因のみで観測される障害レベルと比較して、他の別の要因を加えることにより、障害レベルがさらに上昇して見られることを言う。 40

したがって本発明における機能的に同等な蛋白質には、細胞障害作用を増強する活性を備えた蛋白質が含まれる。このような活性は、例えば次のようにして確認することができる。すなわち、細胞を障害する条件下で、活性を確認すべき蛋白質とともに細胞に接触させ、当該細胞の障害のレベルを、該蛋白質を接触させない場合と比較することにより、上記活性を評価することができる。細胞に傷害を与える条件として、次のような条件を示すことができる。

たとえば、細胞障害作用を有する化合物を細胞に接触させることができる。

ある蛋白質を強制発現させた細胞に対して、このような条件を与えたときに、対照と比較して細胞障害作用が増強されていれば、当該蛋白質が上記活性を有することを確認することができる。

10

20

30

40

50

本発明に用いるホスファターゼをコードするポリヌクレオチドは、配列番号：1または配列番号：3に記載の配列情報に基づき作製したプローブおよび/またはプライマーを用いてハイブリダイゼーション法、PCR法等により単離することができる。

これらポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドから発現される蛋白質が前記ホスファターゼと実質に同じ作用を有するものである限り、特に配列番号：1または配列番号：3に記載の配列を有するものに限定されない。すなわち、

1) 前記配列番号に記載の配列を有するポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチド、および

2) 前記ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列に対して1、若しくは、複数(好ましくは数個)のアミノ酸が置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド

が含まれる。このようなポリヌクレオチドは例えば、部位特異的突然変異誘発法(Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel et al. (1987) John Wiley & Sons, Section 8.1-8.5)、PCR法(Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel et al. (1987) John Wiley & Sons, Section 6.1-6.4)、または、通常のハイブリダイゼーション法(Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel et al. (1987) John Wiley & Sons, Section 6.3-6.4)等により容易に得ることができる。

当業者であれば、配列番号：1または配列番号：3に記載の配列を有するポリヌクレオチド、または、その一部をプローブとして、あるいは、該ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、該ポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドを単離することができる。

機能的に同等な蛋白質をコードするためのハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件は、洗浄のための条件として通常「 $1 \times SSC$ 、 $37^\circ C$ 」程度であり、より厳しい条件としては「 $0.5 \times SSC$ 、 $0.1\% SDS$ 、 $42^\circ C$ 」程度であり、さらに厳しい条件としては「 $0.1 \times SSC$ 、 $0.1\% SDS$ 、 $65^\circ C$ 」程度である。ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するポリヌクレオチドを単離し得る。但し、上記ハイブリダイゼーションの条件は例示的なものであり、当業者であれば使用する塩基配列、遺伝子プールの種類等の条件により、プローブ濃度、プローブの長さ、反応時間、反応温度、試薬濃度等を適宜選択し、目的に応じたストリンジェンシーを実現することが可能である。

上述のような方法により単離されるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は、配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有するホスファターゼと比較して、通常、そのアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、より一層好ましくは90%以上(例えば、95%以上)の配列相同性を指す。

アミノ酸配列や塩基配列の相同性はAltschulらによるアルゴリズムGapped BLAST(Nucleic Acids Res. 25:3389-3402(1997))によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN、BLASTX等のプログラムが開発されている。BLASTNプログラムによって塩基配列データベースを対象として解析する場合には、パラメーターは例えば $expect = 10$ 、 $wordlength = 11$ とすることができる。また、BLASTXによってアミノ酸配列データベースを対象として解析する場合には、パラメーターは例えば $expect = 10$ 、 $wordlength = 3$ とすることができる。また、各種のBLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いることもできる。これらの解析方法の具体的な手法は、National Center for Biotechnology Information(NCBI)のホームページ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

10

20

30

40

50

: // www.ncbi.nlm.nih.gov ) 等で参照することができる。

配列番号：2 または配列番号：4 に記載のアミノ酸配列は、各々、配列番号：1 または配列番号：3 に記載の塩基配列によってコードされている。このアミノ酸配列からなる蛋白質は、CREB の脱リン酸化を行う活性を有し、CREB の転写活性の増加を抑制する。本発明の方法には、これらの蛋白質と機能的に同等な活性を有する蛋白質を用いることができる。

機能的に同等な蛋白質には、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法、例えば、部位特異的突然変異誘発法等を利用して製造された蛋白質も含まれる。蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り特に制限されない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。置換されるアミノ酸は、蛋白質の機能保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp は、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln が挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、Asp および Glu が挙げられる。また、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、His が挙げられる。

10

また、ハイブリダイゼーション技術、PCR 法等により異なる組織、動物より機能的に同等な蛋白質をコードする遺伝子を取得し、由来の異なる蛋白質を得ることも可能である。機能的に同等な蛋白質を単離するための生物は特に限定されない。例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、サル、ブタ、ウシ等の哺乳動物を挙げることができる。

20

更に、対象となる蛋白質がそのままでは該活性を有さない場合であっても、なんらかの過程（切断、修飾等）を経ることにより CREB の転写活性の増加を抑制する活性、あるいは細胞障害作用を増強する活性を持つ蛋白質を生成するような蛋白質も、本発明に用いることができる。また、通常、蛋白質の活性には必ずしも全構成アミノ酸が必要とされるものではないので、前記蛋白質の部分ペプチドを用いることもできる。即ち、前記蛋白質と機能的に同等な活性を示すのに必要とされる部分を保持した部分ペプチドは、本発明に用いることができる。部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、ペプチド合成法、あるいは、適当なペプチダーゼ等の酵素を用いた切断によって製造することができる。

本発明に必要な蛋白質は、例えば、配列番号：1 または配列番号：3 に記載の配列を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体から発現させることにより得ることができる。発現された蛋白質は、培養液または細胞画分より通常の方法により精製、単離することが可能である。

30

精製および単離の方法としては、例えば、以下のような方法を挙げることができる。まず、ろ過および遠心等の方法により細胞または上清を回収する。細胞内に蛋白質を発現させた場合には、細胞の細胞壁および/または細胞膜を超音波や磨砕等の物理的な手段、若しくは、ライソザイム等を用いて破碎することが必要となる。このようにして得られた、本発明の蛋白質を含む溶液を透析、カラムクロマトグラフィー（イオン交換、アフィニティー等）、ゲルろ過等の慣用の手段を適宜、組み合わせることで処理することにより、目的とする蛋白質を単離、精製することができる。

40

遺伝子工学的に蛋白質を製造する場合には、親和性を有するポリペプチドをコードする配列を目的蛋白質をコードする遺伝子の末端に付加して発現させることができる。付加したポリペプチドの親和性を、目的とする蛋白質の精製に利用することができる。金属イオンキレート、ビオチン、ストレプトアビジン、抗体等に対して親和性を有するポリペプチドが公知である。例えば、ヒスチジン、リジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸を目的蛋白質に付加すれば、金属イオンとの親和性を利用して容易に蛋白質を精製することができる。

精製された蛋白質は、CREB の脱リン酸化剤として使用することができる。CREB の脱リン酸化剤は、CREB の脱リン酸化を調節する化合物の評価に用いることができる。また、CREB の脱リン酸化剤を利用した評価方法によって見出すことができる、脱リン

50

酸化を阻害する活性を有する化合物は、記憶障害および/または神経変性疾患に対して治療剤/予防剤として用いることができる。

あるいはこうして得られた蛋白質は、細胞の障害作用の増強剤として用いることができる。本発明の細胞障害作用の増強剤は、細胞障害の増強を調節する活性の評価に用いることができる。当該活性を有する化合物は、細胞障害の増強作用の調節に有用である。

更に本発明における細胞の障害作用の増強剤は、たとえば、抗腫瘍剤のような細胞障害作用を有する化合物の効果を増強するために有用である。細胞障害作用を有する化合物として、具体的には、アポトーシス誘導剤を示すことができる。アポトーシス誘導剤には、小胞体カルシウムポンプ阻害剤等が含まれる。たとえば、筋小胞体カルシウムポンプ阻害剤であるタプシガルギン ( thapsigargin ) は、癌の治療を目的とする研究が行われている代表的な細胞障害作用を有する化合物である。本発明の細胞障害作用の増強剤は、細胞障害作用を有する化合物とは別に投与することができる。あるいは、本発明の増強剤を予め細胞障害作用を有する化合物と配合し、その作用が増強された組成物とすることもできる。更に、本発明の細胞障害作用の増強剤には、前記蛋白質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。当該ポリヌクレオチドは、投与後に生体内において細胞障害作用を増強する蛋白質を発現し、目的とする作用を達成することができる。生体内に遺伝子を導入し、目的とする蛋白質を発現させるための技術が公知である。

また、本発明の NT2RM1000377 は、解析により、二特異性プロテインホスファターゼ MKP - 5 のスプライシングバリエーションの一種であることが判明した。したがって、MKP - 5 も NT2RM1000377 と同様な作用を有し、脱リン酸化剤として使用できる。更に、NT2RM1000377 と同じように CREB の脱リン酸化反応を阻害する被験化合物の活性の検出方法、CREB の脱リン酸化反応を阻害する活性を有する化合物の評価方法、および CREB の脱リン酸化方法においても MKP - 5 を使用できる。MKP - 5 を用いて見出された CREB の脱リン酸化反応を阻害する活性を有する化合物は、記憶障害および/または神経変性疾患に対して治療剤/予防剤として用いることができる。MKP - 5 が、CREB の脱リン酸化作用を有することは、本発明者らが見出した新規な知見である。

すなわち本発明は、以下の工程を含む、被験化合物の CREB の脱リン酸化反応を阻害する活性の検出方法に関する。

(1) CREB のリン酸化が可能な条件下で、またはリン酸化された CREB 若しくはそのリン酸化部位を含むペプチドの存在下で、以下の (A) ~ (D) のいずれかに記載の蛋白質に被験化合物を接触させる工程、および

(A) 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(B) 配列番号：5 に記載の塩基配列からなる 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 によってコードされる (A) に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(C) 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(A) に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(D) 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列と 90% 以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(A) に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(2) CREB またはそのリン酸化部位を含むペプチドのリン酸化のレベルを測定する工程

また本発明は、以下の工程を含む、CREB の脱リン酸化反応を阻害する活性を有する化合物の評価方法に関する。

(1) 前記検出方法によって被験化合物の CREB の脱リン酸化反応を阻害する活性を検出する工程、および

(2) 被験化合物不存在下での CREB のリン酸化レベルと比較して、リン酸化レベルが高い被験化合物を選択する工程

更に本発明は、これらの評価方法によって選択される化合物を有効成分として含有する C

10

20

30

40

50

R E B の脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強に対する抑制剤、あるいは、記憶障害および/または神経変性疾患治療剤に関する。また本発明は、この評価方法によって選択される化合物を投与する工程を含む記憶障害および/または神経変性疾患の治療方法に関する。あるいは本発明は、この評価方法によって選択される化合物の、記憶障害および/または神経変性疾患治療剤の製造における使用に関する。

また本発明は、以下の要素を含む、被験化合物の C R E B の脱リン酸化反応を阻害する活性の検出用キットに関する。

(1) 前記(A) ~ (D) のいずれかに記載の蛋白質、および

(2) C R E B のリン酸化のレベルを測定するための手段

あるいは本発明は、以下の要素を含む、被験化合物の細胞障害作用の増強を調節する活性の検出用キットに関する。 10

(1) 前記(a) ~ (d) のいずれかに記載の蛋白質を発現する細胞、および

(2) 前記細胞に対する障害作用を有する化合物

本発明のキットには、目的に応じて付加的な要素を組み合わせることができる。たとえば、目的とする活性を有する(または有しない)ことが明らかな化合物を陰性対照や陽性対照として組み合わせることができる。また細胞の培養を必要とするキットにおいては、細胞を培養するための培地や培養容器を組み合わせることができる。更に、細胞の障害作用を評価することが必要なキットにおいては、細胞の障害レベルを評価するための要素を組み合わせることができる。たとえば神経細胞 P C 1 2 の細胞障害レベルは、培養上清中の L D H を指標として評価することができる。したがって、L D H の活性測定用の試薬をキットに組み 20

また本発明は、前記(A) ~ (D) のいずれかに記載の蛋白質の発現を調節したトランスジェニック非ヒト動物からなる、C R E B のリン酸化状態が調節されたモデル動物に関する。

加えて本発明は、前記(A) ~ (D) のいずれかに記載の蛋白質と C R E B とを接触させる工程を含む、C R E B の脱リン酸化方法に関する。あるいは本発明は、前記(A) ~ (D) のいずれかに記載の蛋白質を主成分として含む C R E B の脱リン酸化剤に関する。また本発明は、前記(A) ~ (D) のいずれかに記載の蛋白質の、C R E B の脱リン酸化剤の製造における使用に関する。

更に本発明は、配列番号: 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号: 6 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を持つ蛋白質、または該蛋白質をコードする遺伝子を含有する C R E B の脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強に対する抑制剤、あるいは記憶障害および/または神経変性疾患治療剤に関する。 30

また本発明は、配列番号: 5 に記載の塩基配列に対して相補的な配列を有し、配列番号: 5 に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現を阻害するアンチセンス核酸を含有する C R E B の脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強に対する抑制剤、あるいは記憶障害および/または神経変性疾患治療剤に関する。加えて本発明は、前記(A) ~ (D) のいずれかに記載の蛋白質に対する抗体を主成分として含む C R E B の脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強に対する抑制剤、あるいは記憶障害および/または神経変性疾患治療剤に関する。 40

本発明に用いる蛋白質を遺伝子工学的な手法により発現させる際には、使用する宿主細胞の種類に応じ適当な発現ベクターを選択することが必要である。本発明に用いる蛋白質を発現させるための宿主細胞は限定されない。具体的には、大腸菌および枯草菌等の原核生物、並びに、酵母、昆虫細胞、両生類等の動物細胞、および哺乳動物細胞等の真核細胞を宿主細胞として挙げるができる。

通常、原核生物を用いる場合には、プロモーター、開始コドン、目的蛋白質をコードする配列、終止コドンおよび自己複製ユニットを含む発現ベクターを用いる。真核細胞を宿主とする場合には、プロモーター、開始コドン、目的蛋白質をコードする配列および終止コ 50



ドンから構成される発現ベクターを用いることが好ましい。必要に応じ、エンハンサー配列、目的蛋白質の5'および3'非コード領域、ポリアデニル化部位および自己複製可能単位を挿入することもできる。

細菌を宿主とする場合のプロモーターという語句は、プロモーター、オペレーターおよびシャイン-ダルガーノ(SD)配列からなるプロモーター・オペレーター領域を意味する。適当なプロモーターの例として、ラクトースオペロン、PLプロモーター、トリプトファンプロモーター等が挙げられる。酵母を宿主とする場合のプロモーターの例としては、pho5プロモーターがある。哺乳動物細胞を用いた発現で使用し得るプロモーターの例としては、HTLV-LTRプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、CMVプロモーター、マウス・メタロチオネインプロモーター等が挙げられる。本発明の実施に必要とされるDNAのクローニング、プラスミドの構築、宿主の形質転換、その培養、および培養物からの蛋白質の回収等に必要とされる操作は、当業者であれば公知の方法(Molecular Cloning 2nd Edition, T. Maniatis et al., Cold Springs Harbor Laboratory (1989); Molecular Cloning 3rd Edition, T. Maniatis et al., Cold Springs Harbor Laboratory (2001); DNA Cloning, D. M. Glover, IRL Press (1985)等)に従って行うことができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入は、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法(Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (1987) John Wiley & Sons, Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法等の公知の方法に従って行うことができる。

本発明においてCREBのリン酸化レベルは、例えば、CREB、cAMP、および前記蛋白質の存在下におけるCREレポーター遺伝子の発現レベルを観察することによって評価することができる。例えば、前記蛋白質をコードする遺伝子を発現ベクター中に挿入し、CREレポーター遺伝子と共に細胞内へ導入する。細胞のcAMPをフォルスコリン等の化合物を添加することにより誘導する際に被験化合物を存在させ、CREレポーター遺伝子の発現を確認することによりCREBの脱リン酸化反応を阻害する活性を検出することができる。

in vivoにおいて前記蛋白質をコードする遺伝子、およびCREレポーター遺伝子を発現させる場合には、後に述べるような発現ベクターを用いることができる。宿主細胞としては、CREBを発現するが、前記蛋白質をコードする遺伝子が発現されないか、該遺伝子が欠失された動物細胞を用いることができる。このような細胞としては、PC12細胞、Jarkat細胞、初代培養神経細胞、ニューロプラストーマ(SH-SY5Y, IMR32, Neuro2a)を示すことができる。

ここでCREレポーター遺伝子とは、CRE領域と、レポーター遺伝子とが結合されたものである。CRE領域は、cAMPにより発現の促進される遺伝子群の転写制御部位中のcAMPによる誘導に不可欠な部分である。cAMPにより発現の促進される遺伝子群としては、ソマトスタチン、c-fos等が知られている。その塩基配列は、TGACGTTC Aの8塩基、または、これに類似した構造のパリンドローム構造である。また、レポーター遺伝子としてはルシフェラーゼ、カタラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびGFP (Green Fluorescent Protein)等をコードする遺伝子を挙げることができる。

前記蛋白質による脱リン酸化を阻害する活性は、in vitroにおいて測定することもできる。たとえば、前記蛋白質とリン酸化されたCREBを被験化合物の存在下でインキュベート後、CREBのリン酸化のレベルの変化を測定することによって、前記活性を測定することができる。CREBのリン酸化レベルの変化は、たとえばCREBのリン酸化レベルを識別することができる抗体を利用して測定することができる。

CREBのアミノ酸配列は公知(GenBank No. M27691)であり、該配列

10

20

30

40

50

情報をもとにCREBを公知の方法（例えば、本発明に用いる蛋白質の入手法で例示したようなハイブリダイゼーション技術、PCR法、および遺伝子工学的な手法等）に従って入手することは当業者が容易になし得ることである。また、CREBのリン酸化は以下のような方法に従って行うことができる。細胞上清を除去し、PBS等で洗浄した後、可溶化バッファー（10mM TrisHCl pH7.4, 1% triton X100, 1% SDS, 0.2mM sodium vandate, 10mM sodium fluoride, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 2μg/ml leupeptin, 2μg/ml aproptinin）で蛋白質を可溶化する。次に、サンプルを変性させずにSDS-PAGE電気泳動し、分離する。電気泳動後、電気泳動したサンプルをPVDFフィルターにトランスファーし、抗リン酸化CREB抗体で同定する（Beitner-Johnson D. et al. J. Biol. Chem. (1998 Jul. 31) 273(31): 19834-9）。

10

蛋白質のリン酸化レベルを識別し得る抗体の調製方法は公知である。例えば、CREBは、その133位のセリンがリン酸化される。したがって、リン酸化したセリンを用いて、133位のセリンを含むアミノ酸配列からなるオリゴペプチドを合成し、免疫原とすることでCREBのリン酸化レベルを識別する抗体を得ることができる。また、リン酸化CREBに対する抗体は市販されている。例えば#9191Sは、NEW ENGLAND BIO LAB Inc. が販売するリン酸化CREBに対する抗体である。

前記蛋白質による脱リン酸化を阻害する活性の検出方法に必要な要素は、予め組み合わせたキットとすることができる。すなわち本発明は、次の要素からなる被験化合物の、前記蛋白質によるCREBの脱リン酸化反応を阻害する活性の検出用キットに関する。

20

(1) 前記(a)~(d)に記載の蛋白質、および

(2) CREBのリン酸化のレベルを測定するための手段

本発明のキットには、更にCREB、および/またはCREBのリン酸化部位を含むアミノ酸配列からなるペプチドを組み合わせたことができる。本発明のキットを構成するCREBおよび/またはCREBのリン酸化部位を含むアミノ酸配列からなるペプチドは、前記検出方法において、予めリン酸化されるか、あるいはそのリン酸化が可能な条件下で用いられる。リン酸化が可能な条件を与えるために必要な要素をキットに付加することもできる。

具体的には、CREBを細胞に発現させる場合には、細胞にcAMPを作用させることによってCREBのリン酸化が達成される。したがって、CREB産生細胞、この細胞を培養するための培地、そしてcAMPをキットの構成要素とすることができる。あるいは、リン酸化されたCREBやCREBのリン酸化部位を含むアミノ酸配列からなるペプチドを構成要素とすることもできる。

30

本発明のキットにおいて、CREBのリン酸化のレベルを測定するための手段とは、たとえば前記のCREレポーター遺伝子発現系やCREBのリン酸化レベルを識別することができる抗体を示すことができる。

本発明のキットには、陽性や陰性の結果を与える対照試料や取り扱い指示書を組み合わせることもできる。本発明のキットは、以下に述べる評価方法に有用である。本発明のキットによって以下の評価方法を実施する場合には、評価のための被験化合物を組み合わせることもできる。

40

本発明は、前記検出方法を応用した評価方法に関する。本発明の評価方法は以下の工程を含む。

(1) 前記検出方法によって被験化合物のCREBの脱リン酸化反応を阻害する活性を検出する工程、および

(2) 被験化合物不存在下でのCREBのリン酸化レベルと比較して、リン酸化レベルが高い被験化合物を選択する工程

一方本発明の評価に用いる被験化合物としては、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物、公知のコンビナトリアルケミストリーの技術により製造された合成化合物等が挙げられる。該被験化合物にはさらにドミナ

50

ントネガティブ体、アンチセンス核酸、抗体等の高分子化合物も含まれる。これらの被験化合物は単なる例示であり、これに限定されるものではない。

更に本発明による、細胞障害作用の増強に対する調節活性の検出方法を利用して、当該活性を有する化合物を選択することができる。すなわち本発明は、以下の工程を含む、細胞障害作用の調節活性を有する化合物の選択方法に関する。

(1) 前記方法によって被験化合物の細胞障害作用の調節活性を検出する工程、および

(2) 対照と比較して、細胞障害レベルに差がある被験化合物を選択する工程

本発明によって選択される化合物は、細胞障害作用の増強を調節する作用を有する。細胞障害作用の増強を調節する活性には、増強の抑制と刺激が含まれる。細胞障害作用の増強を抑制する活性を有する化合物は、O V A R C 1 0 0 0 4 7 3 (配列番号: 1) および N T 2 R M 1 0 0 0 3 7 7 (配列番号: 3) によってコードされる蛋白質の、細胞障害作用の増強を抑制する。

10

本発明の方法において、被験化合物には先に述べたフォスファターゼ活性の調節活性の評価方法において例示されたような化合物を用いることができる。更に、上記の方法によって脱リン酸化反応の阻害作用を有することが見出された化合物を被験化合物として、更に本発明に基づく細胞障害の増強を調節する活性の評価方法を実施することもできる。こうして選択された化合物は、脱リン酸化を阻害する作用とともに、細胞障害の増強を抑制する作用をも併せ持つ化合物である。このような化合物は、神経細胞の障害をはじめとする様々な細胞の障害に起因する疾患の治療に有用である。

細胞障害作用の増強は、神経細胞の障害をはじめとする様々な細胞の障害に起因する疾患の病態を構成している。したがって、細胞障害作用の増強を抑制することができる化合物は、これらの疾患の治療や予防に有用である。

20

本発明により、配列番号: 2 または配列番号: 4 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質に、CREBの脱リン酸化作用、並びに細胞障害の増強作用が見出された。したがって、この蛋白質の活性や発現を抑制することにより、生体内におけるCREBの脱リン酸化反応、あるいは細胞障害の増強を制御することができる。蛋白質の活性や発現を制御するには、たとえばドミナントネガティブ体やアンチセンス核酸を利用することができる。

すなわち本発明は、配列番号: 2 または配列番号: 4 に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号: 2 または配列番号: 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を持つ蛋白質、または該蛋白質をコードする遺伝子を含有するCREBの脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強に対する抑制剤、あるいは記憶障害および/または神経変性疾患治療剤に関する。

30

また本発明は、配列番号: 1 または配列番号: 3 に記載の塩基配列に対して相補的な配列を有し、配列番号: 1 または配列番号: 3 に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現を阻害するアンチセンス核酸を含有するCREBの脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強に対する抑制剤、あるいは記憶障害および/または神経変性疾患治療剤に関する。

ここで、ドミナントネガティブ体とは、配列番号: 2 または配列番号: 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を持つ蛋白質を指す。このようなドミナントネガティブ体は、細胞がもともと備えている内在性の野生型蛋白質の活性を消失もしくは低下させる機能を有する。例えば、配列番号: 2、または配列番号: 4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、該配列によりコードされる蛋白質の活性に影響すると考えられる配列に相当するアミノ酸配列を改変することによって、CREBの脱リン酸化活性および/または細胞障害の増強活性が低い、あるいは活性が無い不活性体を得ることができる。

40

このようなドミナントネガティブ体を細胞へ投与するか、または該ドミナントネガティブ体をコードする遺伝子を細胞内で発現させることにより、CREBの脱リン酸化および/または細胞障害の増強をドミナントネガティブ効果(不活性型の拮抗阻害)により抑制することができる。従って、本発明のドミナントネガティブ体、または該ドミナントネガティブ体をコードする遺伝子は、CREBの脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強

50

に対する抑制剤、または、記憶障害および/または神経変性疾患の治療若しくは予防剤として用いることができる。

また、本発明におけるアンチセンス核酸とは、配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の発現を抑制するポリヌクレオチドを意味する。即ち、このような活性を有するアンチセンス核酸は、CREBの脱リン酸化および/または細胞障害の増強を抑制し、CREBの脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強に対する抑制剤、または、記憶障害および/または神経変性疾患の治療若しくは予防剤として用いることができる。

アンチセンス核酸は、アンチセンスDNAでもアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。アンチセンスDNAは、好ましくは数十bp以上の鎖長を有する。該アンチセンスDNAを単独あるいは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター等の適当なベクターにアンチセンス方向に挿入して用いることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも10bp以上、通常100bp以内、好ましくは20bp以上、50bp以内の鎖長を有する。該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列情報を基にホスホロチオエート法(Stein "Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides." *Nucleic Acids Res.* 16:3209-3221 (1988))等により調製することができる。

このようなアンチセンス核酸には、配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に起因する疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のウイルスベクターやリポソーム等の非ウイルスベクター等を利用して、*ex vivo*法や*in vivo*法等により患者へ投与することができる。

また、本発明に用いるホスファターゼに結合する抗体は、CREBの脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強に対する抑制剤、並びに、該ホスファターゼの関連する疾患、例えば記憶障害および/または神経変性疾患の予防および治療等に利用することもできる。本発明のCREBの脱リン酸化反応の阻害剤、細胞障害作用の増強に対する抑制剤、または、記憶障害および/または神経変性疾患の予防剤若しくは治療剤として用い得る抗体とは、以下の(a)~(b)のいずれかに記載の蛋白質に対する抗体である。

(a) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列からなる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によってコードされる(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列と90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載の蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

本発明に用いる抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体、または抗原結合性を有するそれらの断片も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、ヒト化抗体等の特殊抗体も含まれる。

ポリクローナル抗体は、前述の(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質、またはそれらの部分ペプチドを免疫動物に免疫することにより得ることができる(*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12~11.13)。

一方、モノクローナル抗体は、該蛋白質または部分ペプチドを用いて免疫動物を免疫し、その抗体産生細胞と骨髄腫細胞等を細胞融合させたハイブリドーマ細胞の中から得ることができる(*Current protocols in Molecular Biol*

10

20

30

40

50

ogy edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4 ~ 11.11)。

抗体を患者の予防・治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウス(例えば、“Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice”, Mendez, M. J. et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156)に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組換えによって調製することができる(Methods in Enzymology 203:99-121(1991))。

上記(a)~(d)のいずれかに記載の蛋白質、すなわち、本発明に用いるホスファターゼに結合する抗体は、該ホスファターゼの精製に加え、これらのホスファターゼの発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞等から蛋白質を抽出し、ウエスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による前記蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

本発明に基づいて単離される化合物は、生体内のCREBの転写活性を促進する化合物の候補となる。これらの化合物は、前記蛋白質が関連する疾患の予防や治療のための医薬として有用である。即ち、本発明の評価方法により、CREBの転写活性が関与する幅広い記憶障害および/または神経変性を改善するための医薬、治療剤および予防剤として有用な化合物を評価することができる。

あるいは本発明に基づいて単離される化合物は、生体内の細胞障害の増強を調節する化合物の候補となる。これらの化合物は、前記蛋白質が関連する疾患の予防や治療のための医薬として有用である。即ち、本発明の評価方法により、細胞障害の増強活性が関与する幅広い細胞障害を改善するための医薬、治療剤および予防剤として有用な化合物を評価することができる。

本発明の評価方法は、目的とする活性を有する化合物のスクリーニング方法や、化合物のキャラクタリゼーション等に利用することができる。

上記評価方法に基づいてスクリーニングされた化合物は、CREBの脱リン酸化反応の阻害剤、あるいは細胞障害作用の増強に対する抑制剤として有用である。CREBの脱リン酸化反応の阻害剤は、CREBの活性化によってもたらされる種々のアポトーシスを伴う疾患の治療や予防に用いることができる。また細胞障害作用の増強に対する抑制剤は、細胞障害作用の増強によってもたらされる様々な疾患の治療や予防に有用である。このような疾患としては、たとえば次のような疾患を示すことができる。

心筋梗塞、心筋炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、肝硬変、インスリン依存性糖尿病(膵臓ランゲルハンス島細胞の免疫反応性細胞死による)、脳梗塞

また上記評価方法に基づいてスクリーニングされた化合物は、記憶障害および/または神経変性を改善すると考えられ、幅広い神経疾患を予防、または、治療するための医薬として有用である。

本発明において記憶障害および/または神経変性疾患とは、CREB活性の制御や神経細胞における細胞障害の増強の抑制によって改善される疾患を意味する。例えば、CREB活性の上昇は神経細胞の抗アポトーシス活性と結びついていることから、本発明のスクリーニング方法により得られる脱リン酸化反応の阻害剤は、以下のような疾病の治療や予防に有用である。

脳血管障害性痴呆、多発性微小脳梗塞、脳血栓症、脳梗塞、脳出血、神経変性疾患(アルツハイマー等)、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮病

上記疾患はいずれも細胞障害を伴うことから、本発明によって選択される細胞障害の増強を抑制する化合物も同様に、上記のような疾患の治療や予防に用いることができる。

本発明においてこれらを医薬品として用いる場合には、それ自体として医薬品として用い

10

20

30

40

50

ることも可能であるが、公知の製剤学的方法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体若しくは媒体、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤等、製剤に用いられる公知のものと適宜組み合わせることで製剤化することができる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の公知の方法により行うことができる。投与量は、患者の体重、年齢および病状、並びに、用いる投与方法等により変わるものであるが、当業者であれば適切な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がポリヌクレオチドによりコードされ得るものであれば、該化合物をコードするDNA等のポリヌクレオチドを遺伝子治療用のベクターに組み込み、遺伝子治療において用いることも考えられる。

10

加えて本発明は、前記CREBの脱リン酸化反応を触媒する蛋白質の発現レベルを調節したトランスジェニック非ヒト動物からなる、CREBのリン酸化状態が調節されたモデル動物に関する。本発明者らによって、前記蛋白質がCREBの脱リン酸化反応を触媒していることが明らかにされた。この知見に基づいて、前記蛋白質の発現を調節することによって、CREBのリン酸化状態を調節することができる。

前記脱リン酸化反応を触媒する蛋白質をコードする遺伝子が導入された動物においては、生体内のCREBのリン酸化状態が弱められる。その結果、CREBによる転写活性が減少し、記憶障害や神経変性等が起きると予想される。このような動物をモデルとして、その症状が緩和されるような化合物を評価することも可能である。

また、その動物における前記CREBの脱リン酸化反応を触媒する蛋白質の発現を弱めた動物では、CREBのリン酸化レベルが亢進する。その結果、CREBによる転写活性が増強された状態を作り出すことができる。このような動物は、記憶や神経細胞を維持するために必要な分子等を見出すためのモデルとして有用である。本発明において、発現を弱めた動物とは、当該蛋白質の発現を阻止した動物（ノックアウト）に加え、他の遺伝子に組み換えた動物（ノックイン）や蛋白質のアミノ酸配列に変異を与えてその活性を低下させた動物が含まれる。

20

あるいは本発明は、前記細胞障害作用を増強する蛋白質の発現レベルを調節したトランスジェニック非ヒト動物からなる、細胞障害作用が調節されたモデル動物に関する。本発明者らによって、前記蛋白質が細胞障害作用を増強することが明らかにされた。この知見に基づいて、前記蛋白質の発現を調節することによって、細胞障害作用を調節することが

30

できる。前記細胞障害作用を増強する蛋白質をコードする遺伝子が導入された動物においては、生体内の細胞障害作用が増強される。その結果、細胞は障害されやすい状態に置かれ、記憶障害や神経変性等が起きると予想される。このような動物をモデルとして、その細胞の障害が緩和されるような化合物を評価することも可能である。

また、その動物における前記細胞障害を増強する蛋白質の発現を弱めた動物では、細胞障害の増強が抑制される。このような動物は、記憶や神経細胞を維持するために必要な分子等を見出すためのモデルとして有用である。

目的とする遺伝子の発現を調節したトランスジェニック動物を得る方法は公知である（例えば、米国特許第4,736,866号；日経サイエンスVol.25, No.6:40-50(1995)参照）。すなわち、細胞分化の初期段階で外来遺伝子を導入するか、目的遺伝子を相同組換え等の技術を利用して欠失させる。この胚から発生する個体は、遺伝子を操作した細胞を有するキメラ動物となる。キメラ動物の子孫が遺伝子の変異を持つ場合は、その個体は遺伝子の変異をヘテロに有するトランスジェニック動物である。ヘテロのトランスジェニック動物同士を交配することにより、ホモで変異を有するトランスジェニック動物を得ることができる。

40

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明は下記の実施例により限定さ

50

れない。

### 1. フォリスコリンによる転写活性の上昇に対するホスファターゼ関連遺伝子の作用

#### (1) ヘリックスクローン由来の発現ベクター及びレポーター発現ベクター

ヘリックス研究所等のcDNAライブラリーから、BLASTアルゴリズムによって、ホスファターゼモチーフを有する6個のホスファターゼ関連遺伝子を選択した。得られた各遺伝子をDrainIで切断したベクターpME18SFL3 (GenBank AB009864, Expression Vector)にcDNAの方向性を決めてクローニングし、ホスファターゼ関連遺伝子発現ベクターとした。

pME18DFL3-377は、pME18SFL3のCMV IEプロモーター下流にヘリックスクローンNT2RM1000377由来の遺伝子を連結させた発現ベクターである。pME18DFL3-473は、CMV IEプロモーター下流にヘリックスクローンOVARC1000473由来の遺伝子を連結させた発現ベクターである。

pCRE-Luc (Stratagene)は、CREエレメントを有するプロモーターの下流に、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子が連結されたレポーター発現ベクターである。pRL3-SV40 (Promega)は、SV40 earlyプロモーター下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子が連結されたレポーター発現ベクターである。

#### (2) PC12細胞への遺伝子の導入

0.5mlのopti-MEM培地 (invitrogen)に10 $\mu$ g pCRE-Luc (Stratagene)、0.2 $\mu$ g pRL3-SV40、および10 $\mu$ gホスファターゼ関連遺伝子発現ベクターを加えて室温で5分間静置した。ここで、ヘリックスクローン関連遺伝子発現ベクターとしては、pME18DFL3-377、pME18DFL3-473、またはコントロールとしてpBluescriptを用いた。一方、0.5mlのopti-MEM培地 (invitrogen)と20 $\mu$ lのlipofectamine 2000 (invitrogen)を混合して室温で3分間静置した。これらのベクター混合液とlipofectamine 2000希釈液とを混ぜ、さらに室温で20分間インキュベーションを行なうことにより、Lipofectamine 2000とベクターとのコンジュゲートを作製した。あらかじめコラーゲンタイプIでコートしたカルチャーフラスコ (25cm<sup>2</sup>、コーニング社製)に1.0 $\times$ 10<sup>6</sup>となるように播種し、3mlの10% FCSを含むRPMI 1640培地で37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションしたPC12細胞に、このコンジュゲートを滴下して加え、さらに37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

#### (3) CREB転写活性の測定

上述の(2)の方法で得られた遺伝子導入細胞を、コラーゲンタイプI (日本ハム)でコートした96ウエルプレートに各ウエルあたり5 $\times$ 10<sup>5</sup>個ずつ播種して、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した後、RPMI 1640培地で洗浄し、Forskolin (Sigma)を10 $\mu$ Mの濃度に加えて、さらに8時間、37 $^{\circ}$ Cで培養した後、以下に述べる方法でCREBの活性測定を行なった。即ち、吸引により上清を除去し、20 $\mu$ lのlysis buffer (12.5mM TrisHCl pH7.4, 1% Triton X)で細胞を溶解した。これにDual luciferase assay kit (Promega)中のホタルルシフェラーゼ基質液 (50 $\mu$ l)及びウミシイタケルシフェラーゼ基質液 (50 $\mu$ l)を加え、化学発光量を測定した。測定機器としてWallac 1420 ARVOSx (Amersham Pharmacia)を用いた。ウミシイタケルシフェラーゼ活性に対するホタルルシフェラーゼ活性の比をCREB転写活性とした。

このようにして測定されたCREB転写活性の結果を図2に示す。図2は3連実験の平均を示す。縦軸は、pCRE-Lucを導入していない場合を0%とし、pCRE-Luc、pBluescriptで形質転換し、フォリスコリンで刺激した場合を100%とした相対的なCREB転写活性 (%)を示している。ヘリックスクローンOVARC1000473及びNT2RM1000377由来の各遺伝子を導入したPC12細胞においては、Forskolin刺激によるCREB転写活性の増加が有意に抑制されることが見

だされた。この結果及び予想される蛋白質のアミノ酸配列の構造的特徴から、これら2つの遺伝子は、CREBの脱リン酸化を触媒するホスファターゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子と同定した。

## 2. ドラッグスクリーニング系の構築

10 µg pCRE-Luc (Stratagene)、2 µg pRL3-SV40、および0 µgから10 µgのpME18DFL3-377を、実施例1(2)と同様の方法で、PC12細胞へ導入した。また、control vectorとしては、0 µgから10 µgのpME18SFL3を用い、pME18DFL3-377との合計量が10 µgとなるようにした。これらの遺伝子導入細胞を、コラーゲンタイプI(日本ハム)でコートした96ウエルプレートに各ウエルあたり $5 \times 10^5$ 個ずつ播種して、37°Cでさらに一晩培養した。その後、RPMI1640培地で洗浄し、マウス2.5S NGF (Promega)を10 ng/mlの濃度に加えて、さらに8時間、37°Cで培養した後、以下に述べる方法でCREBの活性測定を行なった。即ち、吸引により上清を除去し、20 µlのlysis buffer (12.5 mM Tris HCl pH 7.4, 1% Triton X)で細胞を溶解した。これにDual luciferase assay kit (Promega)中のホタルルシフェラーゼ基質液(50 µl)及びウミシタケルシフェラーゼ基質液(50 µl)を加え、化学発光量を測定した。測定機器としてWallac 1420 ARVOsx (Amersham Pharmacia)を用いた。ウミシタケルシフェラーゼ活性に対するホタルルシフェラーゼ活性の比をCREB転写活性とした。

このようにして測定されたCREB転写活性の結果を図3に示す。図3は3連実験の平均を示す。縦軸は、相対的なCREB転写活性を示す。pRL3-SV40のみを導入しNGF未刺激の場合を0とし、pME18DFL3-377及びpME18SFL3を全く導入しないでpCRE-Luc及びpRL3-SV40のみを導入しNGF未刺激の場合を1としている。ヘリックスクローンNT2RM1000377由来の遺伝子を導入したPC12細胞においては、遺伝子導入に用いた発現ベクターpME18DFL3-377の量に依存してNGF添加によるCREB転写活性の増加が有意に抑制されることが見いだされた。この事実は、NT2RM1000377由来の遺伝子産物がCREB転写活性に対して抑制的に働いていることを示唆している。さらに、上述のアッセイ系において、NGFの添加と同時に、新規な化合物を加えた上で、その添加効果をCREB転写活性として測定することにより、CREB転写活性抑制を回復する新しい薬剤のスクリーニング系が構築可能である。

## 3. 細胞障害に対する増強効果

10 µg pCRE-Luc (Stratagene)、2 µg pRL3-SV40、及び10 µg pME18DFL3-377を、実施例1(2)と同様の方法で、PC12細胞へ導入した。コントロールとしては、pME18DFL3-377の代わりに10 µgのpBluescriptを用いた。

これらの遺伝子導入細胞を、コラーゲン(日本ハム)コートした96ウエルプレートに各ウエルあたり $5 \times 10^5$ 個ずつ播種して、37°Cでさらに一晩培養した。その後、RPMI1640培地で洗浄し、マウス2.5S NGF (Promega)を0 ng/ml, 1 ng/mlまたは10 ng/mlの濃度に加えて、さらに8時間、37°Cで培養した。細胞は一度培地で洗浄後、5% Horse serum及び5% FCSを含むDMEM培地 (Sigma)中に10 nMタブシガルギン (thapsigargin; Sigma)及び神経成長因子 (nerve growth factor; NGF)を加え、18時間インキュベーションした。

PC12細胞はラット副腎褐色細胞腫由来の細胞株である。タブシガルギンは筋小胞体カルシウムポンプ (sarcoplasmic reticulum and endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase pump) 阻害剤である。タブシガルギンの投与は、PC12細胞のアポトーシスを誘導する。またPC12は、NGFにより神経細胞様に分化する。この分化の過程において、CREBによる転写活性が



刺激される。したがって、タブシガルギンとNGFの存在下で、pME18DFL3-377で形質転換したPC12細胞を培養することによって、NT2RM1000377のアポトーシス誘導作用やCREBの転写活性に与える影響を観察することができる。

細胞障害性は、細胞膜の損傷によって細胞外に遊離するLDH(Lactate dehydrogenase)の活性をCytotoxicity Detection Kit(LDH)(Roche)を用いて測定した。インキュベーション後の細胞上清75 $\mu$ lにCytotoxicity Detection Kitを75 $\mu$ l加え、室温で20分間反応させ、490nmの吸光度を測定した。

このようにして測定されたCREB転写活性の結果を図4に示す。ヘリックスクローンNT2RM1000377由来の遺伝子を導入したPC12細胞においては、タブシガルギンによる細胞障害作用が増強されることが示された。

10

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、フォルスコリンによるCREBの活性化に対して抑制を示すクローンとしてOVARC1000473(配列番号:1)およびNT2RM1000377(配列番号:3)が同定された。そして、該遺伝子、および/または、該遺伝子によりコードされる蛋白質を用いた評価方法が提供された。本発明の評価方法によりCREBのリン酸化を抑制する作用を阻害する化合物の評価が可能となる。本発明の評価方法によって選択される化合物は、CREBの転写活性を上昇させる作用を有する。このような化合物は、たとえば記憶障害や神経変性を改善し、幅広い神経疾患に対する医薬として有用である。上記遺伝子NT2RM1000377によってコードされる蛋白質は、細胞障害の増強作用を有していることが確認された。当該蛋白質が、細胞障害を伴う疾患の治療や予防における重要な標的分子であることは明らかである。

20

更に本発明は、上記蛋白質の活性の調節を通じて、細胞障害作用を制御することができることを明らかにした。たとえばNT2RM1000377によってコードされる蛋白質の発現や活性の抑制によって、神経細胞の機能低下の進行を防ぐことができる。したがって、NT2RM1000377の発現や活性を阻害する作用を有する化合物には、記憶障害や神経変性を改善し、幅広い神経疾患に対する医薬として有用である。

他方、NT2RM1000377の発現や活性を刺激することにより、細胞障害作用を増強することができる。より具体的にはタブシガルギンの細胞障害作用をNT2RM1000377によってコードされる蛋白質の作用によって増強することができる。タブシガルギンは腫瘍治療への応用も試みられている化合物である。したがって、その作用を強化する作用を有する蛋白質は、腫瘍治療などに有用である。より具体的には、このような作用を有する蛋白質を神経細胞腫などの治療に用いることができる。

30

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Method for screening of phosphatase inhibitory factor.

10

<130> F3-A0101P

<140>

<141>

<150> JP 2001-335833

20

<151> 2001-10-31

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

30

<210> 1

<211> 1755

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<220>

<221> CDS

<222> (232)..(654)

<220>

<223> C-OVARC1000473

<400> 1

10

tgtcctgcgg gtccaggact gtccgcgggg ttgaggaag gggccgtgcc cggtgccagc 60

ccagggtgctc gggcctggc tccatggccc tggtcacagt gagccgttcg cccccgggca 120

gcggcgcctc cacgcccgtg gggccctggg accaggcggc ccagcgaagg agtcgactcc 180

20

agcgaaggca gagctttgcg gtgctccgtg gggctgtcct gggactgcag g atg gag 237

Met Glu

1

ggg aca atg atg atg cag cag agg cca gtt ctg agc caa cag cac cct 285

30

Gly Thr Met Met Met Gln Gln Arg Pro Val Leu Ser Gln Gln His Pro

5

10

15

agt ttc att ctc aac tct agc cct gca cac tca cct atg gcc cgg gag 333

Ser Phe Ile Leu Asn Ser Ser Pro Ala His Ser Pro Met Ala Arg Glu

20

25

30

40

att gac aac ttc tac cct gag cgc ttc acc tac cac aat gtg cgc ctc 381

Ile Asp Asn Phe Tyr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr His Asn Val Arg Leu

35	40	45	50	
tgg gat gag gag tcg gcc cag ctg ctg ccg cac tgg aag gag acg cac	429			
Trp Asp Glu Glu Ser Ala Gln Leu Leu Pro His Trp Lys Glu Thr His				
	55	60	65	
				10
cgc ttc att gag gct gca aga gca cag ggc acc cac gtg ctg gtc cac	477			
Arg Phe Ile Glu Ala Ala Arg Ala Gln Gly Thr His Val Leu Val His				
	70	75	80	
tgc aag atg ggc gtc agc cgc tca gcg gcc aca gtg ctg gcc tat gcc	525			
Cys Lys Met Gly Val Ser Arg Ser Ala Ala Thr Val Leu Ala Tyr Ala				20
	85	90	95	
atg aag cag tac gaa tgc agc ctg gag cag gcc ctg cgc cac gtg cag	573			
Met Lys Gln Tyr Glu Cys Ser Leu Glu Gln Ala Leu Arg His Val Gln				
	100	105	110	
				30
gag ctc cgg ccc atc gcc cgc ccc aac cct ggc ttc ctg cgc cag ctg	621			
Glu Leu Arg Pro Ile Ala Arg Pro Asn Pro Gly Phe Leu Arg Gln Leu				
	115	120	125	130
cag atc tac cag ggc atc ctg acg gcc aga acc tgagggtggt ggggaggaga	674			
Gln Ile Tyr Gln Gly Ile Leu Thr Ala Arg Thr				40
	135	140		

aggttgtagg catggaagag agccaggcag ccccgaaaga agagcctggg ccacggccac 734

gtataaacct ccgaggggtc atgaggtcca tcagtcttct ggagccctcc ttggagctgg 794

agagcacctc agagaccagt gacatgccag aggtcttctc ttcccacgag tcttcacatg 854

aagagcctct gcagcccttc ccacagcttg caaggaccaa gggaggccag caggtggaca 914

gggggcctca gcctgccctg aagtccgcc agtcagtggg taccctccag ggcagtgccg 974

tggtggccaa ccggaccag gccttccagg agcaggagca ggggcagggg caggggcagg 1034

gagagccctg catttctct acgccaggt tccggaaggt ggtgagacag gccagcgtgc 1094

atgacagtgg agaggagggc gaggcctgag ccctcacaca tgcccacgct cccctgacac 1154

tgaagaggat ccacaactcc ttggagaaac accctcacgt ctgttgccgc acacattcct 1214

ctcagctcgg cccataccc gtcactacag cctcacctcc caccctgtc actacggcct 1274

cactccac cctgtcaet acagcctcac ctctacagc cttaagtccc aggcccatgt 1334

ctgcctgtcc aagggtcaa gactttctaa ctgggatgtg gtagaggac tgaaggtacc 1394

tttgggggca acagaccct agtttcattc tcaactctag cctgcacct cctgtcctct 1454

10

20

30

40

cccagttcat tcctggaacc agccaggcca ggcaaccagt ggccccaaa ggcaggcagg 1514

atctcagge cccagccgcg ggaggctgga agggctggca gatcgcttcc ctcatccacc 1574

tccaccggtc caggtctttg ctgctgtccc cagacctcct gtgacaccac gccagateac 1634

agggcaccag gccagagata gtcttctttt tgtcctttct ggctctggc tagtcagttt 1694

ttcatagcct tacagtatct ggctttgtac tgagaaataa aacacatttt catatttggt 1754

t 1755

10

20

<210> 2

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> C-OVARC1000473

30

<400> 2

Met Glu Gly Thr Met Met Met Gln Gln Arg Pro Val Leu Ser Gln Gln

1

5

10

15

40

His Pro Ser Phe Ile Leu Asn Ser Ser Pro Ala His Ser Pro Met Ala

20

25

30

Arg Glu Ile Asp Asn Phe Tyr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr His Asn Val

35

40

45

Arg Leu Trp Asp Glu Glu Ser Ala Gln Leu Leu Pro His Trp Lys Glu

50

55

60

Thr His Arg Phe Ile Glu Ala Ala Arg Ala Gln Gly Thr His Val Leu

65

70

75

80

Val His Cys Lys Met Gly Val Ser Arg Ser Ala Ala Thr Val Leu Ala

85

90

95

Tyr Ala Met Lys Gln Tyr Glu Cys Ser Leu Glu Gln Ala Leu Arg His

100

105

110

Val Gln Glu Leu Arg Pro Ile Ala Arg Pro Asn Pro Gly Phe Leu Arg

115

120

125

Gln Leu Gln Ile Tyr Gln Gly Ile Leu Thr Ala Arg Thr

130

135

140

<210> 3

<211> 1007

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

20

30

40

<220>

<221> CDS

<222> (325)..(744)

<220>

<223> C-NT2RM1000377

10

<400> 3

aactatgittg ctgctggaga tcaatgaagc cgagtggatg ggggctgaat gtgcgagtcc 60

atagctgaag aggagcgcca gatggtggag gaatacactt atttatgaag tggacttagt 120

20

agttttaagc agaaccatga aaacctctgt gacaactccc tccagctcca agagtgccgg 180

gaggtggggg gcggcgcac cgcggcctcg agcttgctac ctcagcccat cccaccacc 240

cctgacatcg agaacgctga gctcacccec atcttgcect tctgttctct tggcaatgag 300

30

caggatgctc aggacctgga cacc atg cag cgg ctg aac atc ggc tac gtc 351

Met Gln Arg Leu Asn Ile Gly Tyr Val

1

5

atc aac gtc acc act cat ctt ccc ctc tac cac tat gag aaa ggc ctg 399

40

Ile Asn Val Thr Thr His Leu Pro Leu Tyr His Tyr Glu Lys Gly Leu

10

15

20

25



ttc aac tac aag cgg ctg cca gcc act gac agc aac aag cag aac ctg 447  
 Phe Asn Tyr Lys Arg Leu Pro Ala Thr Asp Ser Asn Lys Gln Asn Leu  
                   30                  35                  40

cgg cag tac ttt gaa gag gct ttt gag ttc att gag gaa gct cac cag 495  
 Arg Gln Tyr Phe Glu Glu Ala Phe Glu Phe Ile Glu Glu Ala His Gln 10  
                   45                  50                  55

tgt ggg aag ggg ctt ctc atc cac tgc cag gct ggg gtg tcc cgc tcc 543  
 Cys Gly Lys Gly Leu Leu Ile His Cys Gln Ala Gly Val Ser Arg Ser  
                   60                  65                  70 20

gcc acc atc gtc atc gct tac ttg atg aag cac act cgg atg acc atg 591  
 Ala Thr Ile Val Ile Ala Tyr Leu Met Lys His Thr Arg Met Thr Met  
                   75                  80                  85

act gat gct tat aaa ttt gtc aaa ggc aaa cga cca att atc tcc cca 639  
 Thr Asp Ala Tyr Lys Phe Val Lys Gly Lys Arg Pro Ile Ile Ser Pro 30  
                   90                  95                  100                  105

aac ctt aac ttc atg ggg cag ttg cta gag ttc gag gaa gac cta aac 687  
 Asn Leu Asn Phe Met Gly Gln Leu Leu Glu Phe Glu Glu Asp Leu Asn  
                   110                  115                  120 40

aac ggt gtg aca ccg aga atc ctt aca cca aag ctg atg ggc gtg gag 735

Asn Gly Val Thr Pro Arg Ile Leu Thr Pro Lys Leu Met Gly Val Glu

125

130

135

acg gtt gtg tgacaatggt ctggatggaa aggattgctg ctctocatta 784

Thr Val Val

140

10

ggagacaatg aggaaggagg atggattctg gttttttttc tttctttttt tttgtagctg 844

ggagtaagtt tgtgaatgga aacaaacttg tttaaacact ttacttttaa caagtgtaag 904

aagactataa cttttgatgc cattgagatt cacctoccac aaactgacaa attaaggagg 964

20

ttaaagaagt aattttttta agccaacaat aaaaatataa tac 1007

<210> 4

30

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> C-NT2RM1000377

<400> 4

40

Met Gln Arg Leu Asn Ile Gly Tyr Val Ile Asn Val Thr Thr His Leu

1

5

10

15

Pro Leu Tyr His Tyr Glu Lys Gly Leu Phe Asn Tyr Lys Arg Leu Pro

20

25

30

Ala Thr Asp Ser Asn Lys Gln Asn Leu Arg Gln Tyr Phe Glu Glu Ala

35

40

45

Phe Glu Phe Ile Glu Glu Ala His Gln Cys Gly Lys Gly Leu Leu Ile

50

55

60

10

His Cys Gln Ala Gly Val Ser Arg Ser Ala Thr Ile Val Ile Ala Tyr

65

70

75

80

20

Leu Met Lys His Thr Arg Met Thr Met Thr Asp Ala Tyr Lys Phe Val

85

90

95

Lys Gly Lys Arg Pro Ile Ile Ser Pro Asn Leu Asn Phe Met Gly Gln

100

105

110

30

Leu Leu Glu Phe Glu Glu Asp Leu Asn Asn Gly Val Thr Pro Arg Ile

115

120

125

Leu Thr Pro Lys Leu Met Gly Val Glu Thr Val Val

130

135

140

40

<210> 5

<211> 2051

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10

<222> (285)..(1733)

<223> /codon\_start=1

    /gene="MKP-5"

    /product="dual specificity phosphatase MKP-5"

<300>

20

<308> GenBank/AB026436

<400> 5

tcactatagg gcaattggg cctctagatg catgctcgag cggccgccag tgtgatgat 60

atctgcagaa ttgcacctta cgatttaggt gacactatag aaggtacgcc tgcaggtacc 120

30

ggtccggaat tcccgggtcg acccagcgt ccgcaatgaa gccgagtgaa tgggggctga 180

atgtgcgagt ccatagctga agaggagcgc cagatggtgg aggaatacac ttatttatga 240

aactgtcttg agttcttctt gaattgccag ttttcagcct cctc atg cct ccg tct 296

40

Met Pro Pro Ser

cct tta gac gac agg gta gta gtg gca cta tct agg ccc gtc cga cct 344

Pro Leu Asp Asp Arg Val Val Val Ala Leu Ser Arg Pro Val Arg Pro  
 5 10 15 20

cag gat ctc aac ctt tgt tta gac tct agt tac ctt ggc tct gcc aac 392

Gln Asp Leu Asn Leu Cys Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Gly Ser Ala Asn  
 25 30 35

10

cca ggc agt aac agc cac cct cct gtc atc gcc acc acc gtt gtg tcc 440

Pro Gly Ser Asn Ser His Pro Pro Val Ile Ala Thr Thr Val Val Ser  
 40 45 50

20

ctc aag gct gcg aat ctg acg tat atg ccc tca tcc agc ggc tct gcc 488

Leu Lys Ala Ala Asn Leu Thr Tyr Met Pro Ser Ser Ser Gly Ser Ala  
 55 60 65

cgc tcg ctg aat tgt gga tgc agc agt gcc agc tgc tgc act gtg gca 536

Arg Ser Leu Asn Cys Gly Cys Ser Ser Ala Ser Cys Cys Thr Val Ala  
 70 75 80

30

acc tac gac aag gac aat cag gcc caa acc caa gcc att gcc gct ggc 584

Thr Tyr Asp Lys Asp Asn Gln Ala Gln Thr Gln Ala Ile Ala Ala Gly  
 85 90 95 100

40

acc acc acc act gcc atc gga acc tct acc acc tgc cct gct aac cag 632

Thr Thr Thr Thr Ala Ile Gly Thr Ser Thr Thr Cys Pro Ala Asn Gln

105

110

115

atg gtc aac aat aat gag aat aca ggc tct cta agt cca tca agt ggg 680

Met Val Asn Asn Asn Glu Asn Thr Gly Ser Leu Ser Pro Ser Ser Gly

120

125

130

10

gtg ggc agc cct gtg tca ggg acc ccc aag cag cta gcc agc atc aaa 728

Val Gly Ser Pro Val Ser Gly Thr Pro Lys Gln Leu Ala Ser Ile Lys

135

140

145

ata atc tac ccc aat gac ttg gca aag aag atg acc aaa tgc agc aag 776

Ile Ile Tyr Pro Asn Asp Leu Ala Lys Lys Met Thr Lys Cys Ser Lys

150

155

160

20

agt cac ctg ccg agt cag ggc cct gtc atc att gac tgc agg ccc ttc 824

Ser His Leu Pro Ser Gln Gly Pro Val Ile Ile Asp Cys Arg Pro Phe

165

170

175

180

30

atg gag tac aac aag agt cac atc caa gga gct gtc cac att aac tgt 872

Met Glu Tyr Asn Lys Ser His Ile Gln Gly Ala Val His Ile Asn Cys

185

190

195

40

gcc gat aag atc agc cgg cgg aga ctg cag cag ggc aag atc act gtc 920

Ala Asp Lys Ile Ser Arg Arg Arg Leu Gln Gln Gly Lys Ile Thr Val

200

205

210

cta gac ttg att tcc tgt agg gaa ggc aag gac tct ttc aag agg atc 968  
 Leu Asp Leu Ile Ser Cys Arg Glu Gly Lys Asp Ser Phe Lys Arg Ile  
 215 220 225

ttt tcc aaa gaa att ata gtt tat gat gag aat acc aat gaa cca agc 1016  
 Phe Ser Lys Glu Ile Ile Val Tyr Asp Glu Asn Thr Asn Glu Pro Ser 10  
 230 235 240

cga gtg atg ccc tcc cag cca ctt cac ata gtc ctc gag tcc ctg aag 1064  
 Arg Val Met Pro Ser Gln Pro Leu His Ile Val Leu Glu Ser Leu Lys  
 245 250 255 260 20

aga gaa ggc aaa gaa cct ctg gtg ttg aaa ggt gga ctt agt agt ttt 1112  
 Arg Glu Gly Lys Glu Pro Leu Val Leu Lys Gly Gly Leu Ser Ser Phe  
 265 270 275

aag cag aac cat gaa aac ctc tgt gac aac tcc ctc cag ctc caa gag 1160  
 Lys Gln Asn His Glu Asn Leu Cys Asp Asn Ser Leu Gln Leu Gln Glu 30  
 280 285 290

tgc cgg gag gtg ggg ggc ggc gca tcc gcg gcc tog agc ttg cta oct 1208  
 Cys Arg Glu Val Gly Gly Gly Ala Ser Ala Ala Ser Ser Leu Leu Pro  
 295 300 305 40

cag ccc atc ccc acc acc cct gac atc gag aac gct gag ctc acc ccc 1256

Gln Pro Ile Pro Thr Thr Pro Asp Ile Glu Asn Ala Glu Leu Thr Pro

310

315

320

atc ttg ccc ttc ctg ttc ctt ggc aat gag cag gat gct cag gac ctg 1304

Ile Leu Pro Phe Leu Phe Leu Gly Asn Glu Gln Asp Ala Gln Asp Leu

325

330

335

340

10

gac acc atg cag cgg ctg aac atc ggc tac gtc atc aac gtc acc act 1352

Asp Thr Met Gln Arg Leu Asn Ile Gly Tyr Val Ile Asn Val Thr Thr

345

350

355

cat ctt ccc ctc tac cac tat gag aaa ggc ctg ttc aac tac aag cgg 1400

His Leu Pro Leu Tyr His Tyr Glu Lys Gly Leu Phe Asn Tyr Lys Arg

360

365

370

20

ctg cca gcc act gac agc aac aag cag aac ctg cgg cag tac ttt gaa 1448

Leu Pro Ala Thr Asp Ser Asn Lys Gln Asn Leu Arg Gln Tyr Phe Glu

375

380

385

30

gag gct ttt gag ttc att gag gaa gct cac cag tgt ggg aag ggg ctt 1496

Glu Ala Phe Glu Phe Ile Glu Glu Ala His Gln Cys Gly Lys Gly Leu

390

395

400

40

ctc atc cac tgc cag gct ggg gtg tcc cgc tcc gcc acc atc gtc atc 1544

Leu Ile His Cys Gln Ala Gly Val Ser Arg Ser Ala Thr Ile Val Ile

405

410

415

420



gct tac ttg atg aag cac act cgg atg acc atg act gat gct tat aaa 1592  
 Ala Tyr Leu Met Lys His Thr Arg Met Thr Met Thr Asp Ala Tyr Lys  
                   425                  430                  435

ttt gtc aaa ggc aaa cga cca att atc tcc cca aac ctt aac ttc atg 1640  
 Phe Val Lys Gly Lys Arg Pro Ile Ile Ser Pro Asn Leu Asn Phe Met 10  
                   440                  445                  450

ggg cag ttg cta gag ttc gag gaa gac cta aac aac ggt gtg aca ccg 1688  
 Gly Gln Leu Leu Glu Phe Glu Glu Asp Leu Asn Asn Gly Val Thr Pro  
                   455                  460                  465 20

aga atc ctt aca cca aag ctg atg ggc gtg gag acg gtt gtg tga 1733  
 Arg Ile Leu Thr Pro Lys Leu Met Gly Val Glu Thr Val Val

                  470                  475                  480

caatggtctg gatggaaagg attgctgctc tccattagga gacaatgagg aaggaggatg 1793 30

gattctggtt ttttttcttt cttttttttt tgtagttggg agtaaagttt gtgaatggaa 1853

acaaacttgg ttaaacactt tatttttaac aagtgtgaaga agactatact tttgatgcca 1913

ttgagattca ccttccacaa actggccaaa ttaaggaggt tnaagaagta atttttttta 1973 40

agcccaacca ttaaaaattt aatacaactt ggtttctncc cctttttctt ttaaagctan 2033

tttgtaaaag tttatgag

2051

<210> 6

<211> 482

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Pro Pro Ser Pro Leu Asp Asp Arg Val Val Val Ala Leu Ser Arg

1 5 10 15

20

Pro Val Arg Pro Gln Asp Leu Asn Leu Cys Leu Asp Ser Ser Tyr Leu

20 25 30

Gly Ser Ala Asn Pro Gly Ser Asn Ser His Pro Pro Val Ile Ala Thr

35 40 45

30

Thr Val Val Ser Leu Lys Ala Ala Asn Leu Thr Tyr Met Pro Ser Ser

50 55 60

Ser Gly Ser Ala Arg Ser Leu Asn Cys Gly Cys Ser Ser Ala Ser Cys

65 70 75 80

40

Cys Thr Val Ala Thr Tyr Asp Lys Asp Asn Gln Ala Gln Thr Gln Ala

85

90

95

Ile Ala Ala Gly Thr Thr Thr Thr Ala Ile Gly Thr Ser Thr Thr Cys

100

105

110

Pro Ala Asn Gln Met Val Asn Asn Asn Glu Asn Thr Gly Ser Leu Ser

115

120

125

10

Pro Ser Ser Gly Val Gly Ser Pro Val Ser Gly Thr Pro Lys Gln Leu

130

135

140

Ala Ser Ile Lys Ile Ile Tyr Pro Asn Asp Leu Ala Lys Lys Met Thr

145

150

155

160

20

Lys Cys Ser Lys Ser His Leu Pro Ser Gln Gly Pro Val Ile Ile Asp

165

170

175

Cys Arg Pro Phe Met Glu Tyr Asn Lys Ser His Ile Gln Gly Ala Val

180

185

190

30

His Ile Asn Cys Ala Asp Lys Ile Ser Arg Arg Arg Leu Gln Gln Gly

195

200

205

Lys Ile Thr Val Leu Asp Leu Ile Ser Cys Arg Glu Gly Lys Asp Ser

210

215

220

40

Phe Lys Arg Ile Phe Ser Lys Glu Ile Ile Val Tyr Asp Glu Asn Thr

225

230

235

240

Asn Glu Pro Ser Arg Val Met Pro Ser Gln Pro Leu His Ile Val Leu

245

250

255

10

Glu Ser Leu Lys Arg Glu Gly Lys Glu Pro Leu Val Leu Lys Gly Gly

260

265

270

Leu Ser Ser Phe Lys Gln Asn His Glu Asn Leu Cys Asp Asn Ser Leu

275

280

285

20

Gln Leu Gln Glu Cys Arg Glu Val Gly Gly Gly Ala Ser Ala Ala Ser

290

295

300

Ser Leu Leu Pro Gln Pro Ile Pro Thr Thr Pro Asp Ile Glu Asn Ala

305

310

315

320

30

Glu Leu Thr Pro Ile Leu Pro Phe Leu Phe Leu Gly Asn Glu Gln Asp

325

330

335

Ala Gln Asp Leu Asp Thr Met Gln Arg Leu Asn Ile Gly Tyr Val Ile

340

345

350

40

Asn Val Thr Thr His Leu Pro Leu Tyr His Tyr Glu Lys Gly Leu Phe

355

360

365

Asn Tyr Lys Arg Leu Pro Ala Thr Asp Ser Asn Lys Gln Asn Leu Arg

370

375

380

Gln Tyr Phe Glu Glu Ala Phe Glu Phe Ile Glu Glu Ala His Gln Cys

385

390

395

400

10

Gly Lys Gly Leu Leu Ile His Cys Gln Ala Gly Val Ser Arg Ser Ala

405

410

415

Thr Ile Val Ile Ala Tyr Leu Met Lys His Thr Arg Met Thr Met Thr

420

425

430

20

Asp Ala Tyr Lys Phe Val Lys Gly Lys Arg Pro Ile Ile Ser Pro Asn

435

440

445

Leu Asn Phe Met Gly Gln Leu Leu Glu Phe Glu Glu Asp Leu Asn Asn

450

455

460

30

Gly Val Thr Pro Arg Ile Leu Thr Pro Lys Leu Met Gly Val Glu Thr

465

470

475

480

Val Val

40

【図面の簡単な説明】

図1は、CREBによる転写活性の増加を抑制するクローンである、OVARC1000473（配列番号：1/上）およびNT2RM1000377（配列番号：3/下）によってコードされる蛋白質の構造を示す図である。OVARC1000473のN末端側122-218のアミノ酸配列が二特異性プロテインフォスファターゼと同一性（34%）を有する領域である。NT2RM1000377は、その中央部分30-182のアミノ酸配列が二特異性プロテインフォスファターゼMKP5と同一性（40%）を有する領域である。この領域にフォスファターゼ触媒部位（67-78）およびcdc25様ドメインを含む。

図2は、フォルスコリンによるCREBの転写活性の上昇に対する、OVARC1000473（#1）およびNT2RM1000377（#2）の作用を示

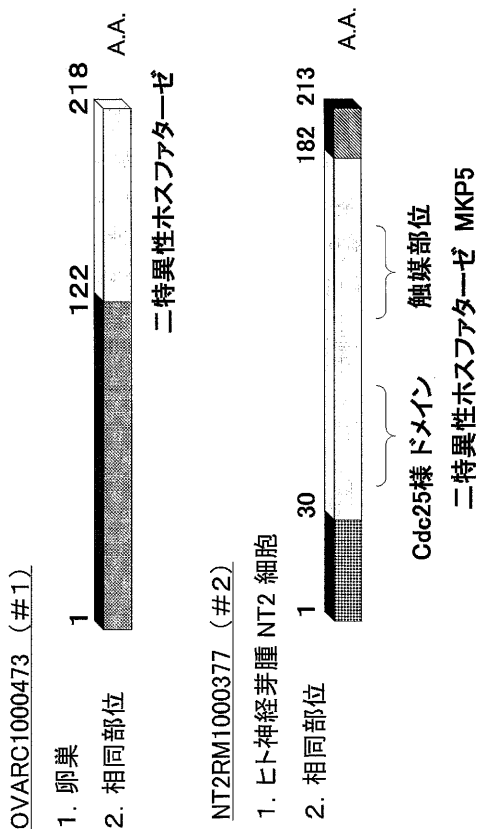
50

す図である。縦軸は、相対的なCREB転写活性(%)を示す。pRL3-SV40のみを導入しフォルスコリン未刺激の場合を0%とし、pCRE-Luc、pRL3-SV40、pBluescriptで形質転換し、フォルスコリンで刺激した場合を100%としている。

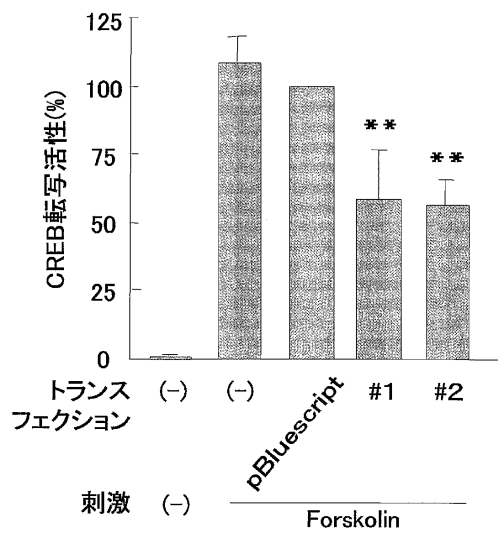
図3は、NGF刺激によるCREB転写活性の上昇が、PC12細胞に導入されたNT2RM1000377の発現ベクターpME18DFL3-377の量に依存して有意に抑制されることを示す図である。縦軸は、相対的なCREB転写活性を示す。pRL3-SV40のみを導入しNGF未刺激の場合を0とし、pCRE-Luc及びpRL3-SV40のみを導入しNGF未刺激の場合を1としてしている。

図4は、NT2RM1000377由来の遺伝子発現ベクターpME18DFL3-377を導入したPC12細胞において、タブシガルギンによる細胞障害が増強されることを示した図である。

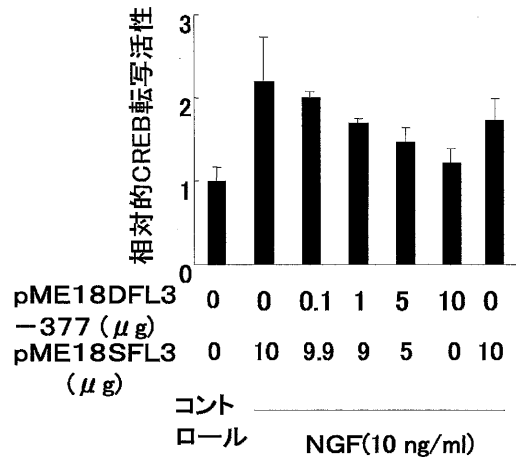
【図1】



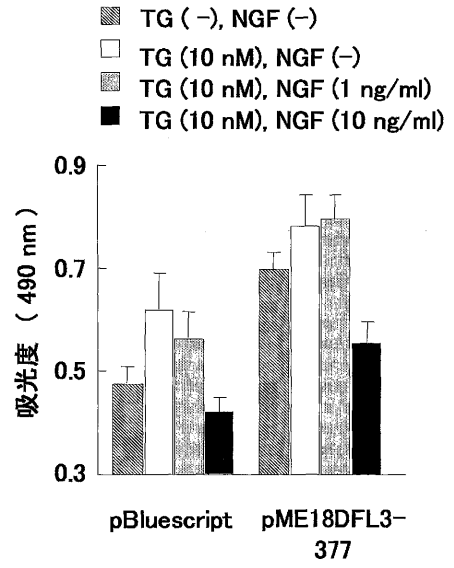
【図2】



【 図 3 】  
図 3



【 図 4 】  
図 4



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/11365
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. <sup>7</sup> C12Q1/48, C12N15/00, A61K31/713, A61K39/395, G01N33/50, G01N33/15, A61P25/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>7</sup> C12Q1/48, C12N15/00, A61K31/713, A61K39/395, G01N33/50, G01N33/15, A61P25/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Swissprot/EIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1074617 A (HERIX RES INST), 07 February, 2001 (07.02.01), & JP 2002-171977 A	1-4,7-23, 29-34
P,A	WO 02/20732 A2 (Bayer AG), 14 March, 2002 (14.03.02), (Family: none)	1-4,7-23, 29-34
A	HAGIWARA M. et al., Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB., Cell, July 1992, Vol.70, No.1, pages 105 to 113	1-4,7-23, 29-34
A	BITO H. et al., CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. Cell, December 1996, Vol.87, No.7, pages 1203 to 1214	1-4,7-23, 29-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 February, 2003 (04.02.03)		Date of mailing of the international search report 18 February, 2003 (18.02.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/11365

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Jane, E.B. REUSCH et al., Insulin Inhibits Dephosphorylation of Adenosine 3',5'-Monophosphate Response Element-Binding Protein/Activating Transcription Factor-1: Effect on Nuclear Phosphoserine Phosphatase-2a. Endocrinology 1994, Vol.135, No.6, pages 2418 to 2422	1-4,7-23, 29-34
A	BE WADZINSKI et al., Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. Molecular and Cellular Biology, 1993, Vol.13, No.5, pages 2822 to 2834	1-4,7-23, 29-34
A	WH WHEAT et al., Simian virus 40 small tumor antigen inhibits dephosphorylation of protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. Molecular and Cellular Biology, 1994, Vol.14, No.9, pages 5881 to 5890	1-4,7-23, 29-34

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/11365**Box I 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.: 5, 6, 24-28  
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:  
Concerning the "compound selected by a method as set forth in claim --" as set forth in the above claims, it is completely unknown what specific compounds are involved in the scope thereof and what are not, even though the whole (continued to extra sheet)
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 II 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:

The proteins shown respectively by SEQ ID NOS:2 and 4 in the present application have no similarity (for example, a significant homology with each other) except the point of each being a CRB-dephosphorylating protein. It is described in Cell, Vol. 70, p. 105-113 (1992) that PP-1 dephosphorylates CREB and thus a CRB-dephosphorylating protein had been publicly known. Thus, "CRB-dephosphorylating protein" cannot be considered as a special technical feature in the meaning as defined in PCT Rule 13.2.

Therefore, it is recognized that the claims involve 2 groups of inventions, i.e., inventions relating to the protein of SEQ ID NO:2 and inventions relating to the protein of SEQ ID NO:4.

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.:  
The part relating to SEQ ID NO:2.

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/11365

Continuation of Box No.1-2 of continuation of first sheet(1)

statement in the description is taken into consideration.  
Thus, the above claims are described in an extremely unclear manner.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/11365	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12Q1/48, C12N15/00, A61K31/713, A61K39/395, G01N33/50, G01N33/15, A61P25/00			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12Q1/48, C12N15/00, A61K31/713, A61K39/395, G01N33/50, G01N33/15, A61P25/00			
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			
国際調査で利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) Swissprot/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)			
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	
A	EP 1074617 A (HERIX RES INST) 2001.02.07 & JP 2002-171977 A	1-4, 7-23, 29-34	
PA	WO 02/20732 A2 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 2002.03.14 (ファミリーなし)	1-4, 7-23, 29-34	
A	HAGIWARA M. et al. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB., Cell, July 1992, Vol. 70, No. 1, p. 105-113	1-4, 7-23, 29-34	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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	04.02.03	国際調査報告の発送日	18.02.03
国際調査機関の名称及び先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一	4 B	9162
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/11365
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
A	BITO H. et al. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. Cell , December 1996, Vol. 87, No. 7, p. 1203-1214	1-4, 7-23, 29-34
A	Jane E. B. REUSCH et al. Insulin Inhibits Dephosphorylation of Adenosine 3', 5'-Monophosphate Response Element-Binding Protein/Activating Transcription Factor-1: Effect on Nuclear Phosphoserine Phosphatase-2a. Endocrinology 1994, Vol. 135, No. 6, p. 2418-2422	1-4, 7-23, 29-34
A	BE WADZINSKI et al. Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. Molecular and Cellular Biology , 1993, Vol. 13, No. 5, p. 2822-2834	1-4, 7-23, 29-34
A	WH WHEAT et al. Simian virus 40 small tumor antigen inhibits dephosphorylation of protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. Molecular and Cellular Biology, 1994, Vol. 14, No. 9, p. 5881-5890	1-4, 7-23, 29-34

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP02/11365
<p><b>第I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)</b>            法第8条第3項 (PCT17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。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 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、</p>	
<p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 5, 6, 24-28 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、            上記請求の範囲に記載の「請求項へに記載の方法によって選択される(された)化合物」について、明細書の記載を参照しても、上記化合物が具体的にどのような化合物を包含し、どのような化合物を包含しないのか全く不明であり、上記請求の範囲の記載は著しく不明確である。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT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。</p>	
<p><b>第II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)</b></p>	
<p>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の国際調査機関は認めた。</p> <p>本願の配列番号：2及び4にそれぞれ記載のタンパク質は、CREBの脱リン酸化を行うタンパク質であるということ以外、両者が有意な相同性を有するなどの類似性は見あたらない。そして、Cell, Vol. 70, P. 105-113 (1992)には、PP-1がCREBの脱リン酸化を行うことが記載されており、CREBの脱リン酸化を行うタンパク質は公知であるといえることから、「CREBの脱リン酸化を行うタンパク質」は、PCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。</p> <p>よって、請求の範囲には、配列番号：2のタンパク質に関連する発明と、配列番号：4のタンパク質に関連する発明との2発明が記載されているものと認められる。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 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。</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 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。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 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ので、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。</p>	
<p>4. <input checked="" type="checkbox"/> 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ので、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。</p> <p style="text-align: center;">配列番号：2に関連する部分</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 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。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>		F I	
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/00		A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28		A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00		A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 9/16		A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 9/99		C 1 2 N 9/16	
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 9/99	
G 0 1 N 33/15		C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/68		G 0 1 N 33/50	Z
// C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/68	
		A 6 1 K 37/02	
		C 1 2 N 15/00	A

- (72)発明者 山崎 真也子  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 佐藤 晋  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 西村 伸太郎  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 喜多 康浩  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 山崎 高生  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。