

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02004/061101

発行日 平成18年5月11日 (2006.5.11)

(43) 国際公開日 平成16年7月22日 (2004.7.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	4 B O 5 0
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 B O 6 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 172 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2004-564542 (P2004-564542)	(71) 出願人	000006677
(21) 国際出願番号	PCT/JP2003/016895		アステラス製薬株式会社
(22) 国際出願日	平成15年12月26日 (2003.12.26)		東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号
(31) 優先権主張番号	特願2002-378800 (P2002-378800)	(74) 代理人	100080791
(32) 優先日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		弁理士 高島 一
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	松岡 秀明
			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	藤村 高穂
			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	林 雅子
			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
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 新規免疫抑制剤の選択方法

(57) 【要約】

本発明は、被験物質のHDAC4及び/又はHDAC8阻害活性を測定することを含む、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法、および被験HDAC阻害剤のHDAC4及び/又はHDAC8阻害活性を測定することを含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 選択的阻害剤を含む G A T A - 1 産生阻害活性の少ない I L - 2 産生阻害剤及び / 又は免疫担当細胞増殖阻害剤。

【請求項 2】

H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤。

【請求項 3】

G A T A - 1 産生阻害活性の少ない I L - 2 産生阻害剤及び / 又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法であって、被験物質の H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 酵素阻害活性を測定することを含ま選択方法。 10

【請求項 4】

血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験物質の H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 酵素阻害活性を測定することを含ま選択方法。

【請求項 5】

以下 (i) (i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法：

(i) 被験物質の H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 酵素阻害活性を測定する；

(i i) 被検物質の H D A C 酵素阻害活性を測定する、ここで、該 H D A C 酵素阻害活性が、H D A C 1、H D A C 2、H D A C 3、H D A C 5、H D A C 6 又は H D A C 7 酵素阻害活性からなる群より選択される 1 以上の H D A C 酵素阻害活性である。 20

【請求項 6】

以下 (i) ~ (i i i) の工程を含む、G A T A - 1 産生阻害活性の少ない I L - 2 産生阻害剤及び / 又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法であって、該 I L - 2 産生阻害剤及び / 又は免疫担当細胞増殖阻害剤が H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、請求項 3 記載の方法：

(i) H D A C 1、H D A C 2、H D A C 3、H D A C 4、H D A C 5、H D A C 6、H D A C 7、H D A C 8 の各遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(i i) 当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、H D A C 酵素活性を測定する；

(i i i) H D A C 4 遺伝子又は H D A C 8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に H D A C 酵素活性を抑制する被験物質を選択する。 30

【請求項 7】

以下 (i) ~ (i i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該免疫抑制剤が H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、請求項 4 記載の方法：

(i) H D A C 1、H D A C 2、H D A C 3、H D A C 4、H D A C 5、H D A C 6、H D A C 7、H D A C 8 の各遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(i i) 当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、H D A C 酵素活性を測定する；

(i i i) H D A C 4 遺伝子又は H D A C 8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に H D A C 酵素活性を抑制する被験物質を選択する。

【請求項 8】

以下 (i) ~ (i i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該免疫抑制剤が H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、請求項 4 記載の方法：

(i) ヒト細胞から部分精製された酵素液を被験物質と共存させ、H D A C 酵素活性を測定する；

(i i) H D A C 4 遺伝子及び / 又は H D A C 8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を被験物質と共存させ、H D A C 酵素活性を測定する；

(i i i) (i) と (i i) との酵素活性を比較し、H D A C 4 遺伝子及び / 又は H D A C 8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に H D A C 酵素活性を抑制する被験物質を選択する。 40

【請求項 9】

以下 (i) ~ (iii) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC 4 と N - C o R との複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする方法：

(i) HDAC 4 遺伝子及び N - C o R 遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(ii) 当該酵素液を被験 HDAC 阻害剤と共存させる；

(iii) (ii) で得られた酵素液と被験 HDAC 阻害剤の混合液において HDAC 4 と N - C o R との複合体が形成されているか否かを解析する。

【請求項 10】

以下 (i) (ii) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC 4 蛋白質の少なくとも一部を含む HDAC 4 融合蛋白質と、N - C o R 蛋白質の少なくとも一部を含む N - C o R 融合蛋白質との複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする方法：

(i) 該 HDAC 4 融合蛋白質をコードする遺伝子、及び該 N - C o R 融合蛋白質をコードする遺伝子を細胞内で発現させる；

(ii) 被験 HDAC 阻害剤が、該 HDAC 4 融合蛋白質と該 N - C o R 融合蛋白質との複合体形成を阻害するか否かを解析する。

【請求項 11】

以下 (i) (ii) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 の発現量を抑制するものを選択することによる方法：

(i) HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 を発現する細胞と被験 HDAC 阻害剤を共存させる；

(ii) 当該細胞における HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 発現量を測定する。

【請求項 12】

以下 (i) (ii) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 と HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 特異的リガンドとの結合を選択的に阻害するものを選択することによる方法：

(i) HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(ii) 当該酵素液を HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 特異的リガンドと被験 HDAC 阻害剤と共存させ、HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 酵素と HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 特異的リガンドとの結合活性を測定する。

【請求項 13】

以下 (i) (ii) を少なくとも含む、HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キット：

(i) HDAC 1、HDAC 2、HDAC 3、HDAC 5、HDAC 6、HDAC 7 の各遺伝子を発現させて得られた酵素液；

(ii) HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 の各遺伝子を発現させて得られた酵素液。

【請求項 14】

配列番号 4 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA。

【請求項 15】

配列番号 4 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする HDAC 4 変異体。

【請求項 16】

有効量の HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 選択的阻害剤を被験体に投与する工程を含む、GATA - 1 産生阻害活性が少ない IL - 2 産生及び / 又は免疫担当細胞増殖の阻害方法。

【請求項 17】

有効量の HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 選択的阻害剤を被験体に投与する工程を含む、

10

20

30

40

50

血小板減少作用が少ない免疫の抑制方法。

【請求項18】

GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤の製造のためのHDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤の使用。

【請求項19】

血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の製造のためのHDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、HDAC4及び/又はHDAC8のみを選択的に抑制することを特徴とする血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤を選択する方法、当該方法によって得られる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤又はGATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤、当該方法に使用されるキット等に関する。

10

【背景技術】

今日、臓器移植後の急性拒絶反応を抑制する為に臨床現場で広く用いられている主要な免疫抑制剤であるシクロスポリンA(Cyclosporin A, CsA)及びタクロリムス(FK506)は、それぞれに特異的なイムノフィリン(immunophilins:例えばCsAの場合にはcyclophilin, FK506の場合は、FKBP12)との結合を通じて、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンの活性を阻害する。その結果、NF-AT(Nuclear Factor of Activated T-cell)の脱リン酸化反応が阻害されることによって、NF-ATの核内移行が阻害され、IL-2遺伝子の転写活性が抑制されることが知られている。このような作用メカニズムの研究から、活性化されたT細胞においてIL-2遺伝子の転写レベルでの発現が特異的に抑制されることが、臓器移植片の拒絶を抑制し、様々な自己免疫疾患等への治療効果を示す上で、極めて重要であることが明らかになっている。

20

ところで、真核生物の細胞核DNAはヌクレオソームを単位構造体としたクロマチン構造を形成し、階層的に折りたたまれている。一個のヌクレオソームには、H2A, H2B, H3, H4の各ヒストンがそれぞれ2分子とH1ヒストン1分子が含まれている。これらのヒストン蛋白質のN-末端側に存在する特定のリジン残基は、しばしばアセチル化の修飾を受け、様々な遺伝子の発現調節に関連していることが知られている。

30

ヒストンN末端側のアセチル化のレベルは、相反する2系統の酵素、すなわちヒストンアセチルトランスフェラーゼ(ヒストンアセチル化酵素, histone acetyltransferase, HAT)とヒストンデアセチラーゼ(ヒストン脱アセチル化酵素, histone deacetylase, 以下、必要に応じてHDACと省略する)の活性のバランスによって精妙に制御されている。このうち、ヒストンデアセチラーゼは、活性中心に亜鉛を配位する金属酵素で、アセチル化されたヒストンからアセチル基を除去する機能を担っており、このようなアセチル基の除去により、クロマチン構造の凝集が生じ、転写抑制につながると考えられている。

40

ヒトのヒストンデアセチラーゼは、一連の研究から、これまでにHDAC1からHDAC11まで、少なくとも11種類のアイソフォーム(isoform)の存在が知られている(例えば、Pandey Ret al., Nucleic Acids Research, 30(23):5036-55(2002); L. Gao et al., Journal of Biological Chemistry, 277(28):25748-25755(2002); Joseph J. BUGGY et al., Biochemical Journal, 350:199-205(2000); 国際公開第WO 00/10583号を参照)。そして、それらの各々のアイソフォームは、単体の酵素として機能している訳ではなく、実際には他の多くの蛋白質と相互作用し、より大きな複合体を構成していることが判明している。それらのHDACアイソフォームの

50

うち、HDAC1, HDAC2, HDAC3, 及びHDAC8は、構造的に酵母のRpd3蛋白質と高い相同性を有しており、クラスIに分類されている。HDAC1やHDAC2は、多数のサブユニット構造を含む複合体の構成要素の一種であり、例えばSIN3複合体やNURD/Mi2複合体の中に見いだされる。HDAC3は、N-CoR (nuclear receptor corepressor) やSMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid) と複合体を形成し、例えばthyroid hormone receptor (TR) やv-ErbAによる転写抑制を仲介することが知られている。一方、酵母のHda1蛋白質に相同性を示す酵素群は、クラスIIに分類され、HDAC4, HDAC5, HDAC6, 及びHDAC7がこのグループに属することが知られている。クラスIIのヒストンデアセチラーゼであるHDAC4, HDAC5やHDAC7は、N-CoR, SMRTやBCL-6による抑制を仲介する付加的なコレプレッサーであるBCoRと相互作用し得ることが知られている。

組換え体のHDAC3は、単体としてはそれ自体不活性であるが、SMRTやN-CoRを添加することによって活性ある酵素として機能し得ることを示唆するデータが報告されている(例えば、Matthew G. Guenther et al., Molecular and Cellular Biology, 21(18):6091-6101(2001)参照) また、クラスII酵素であるHDAC4は、生体内では、SMRTやN-CoRを介してクラスI酵素であるHDAC3と相互作用することが報告されている(例えば、Wolfgang Fischie et al., Molecular Cell, 9:45-57(2002)参照)。しかしながら、これらのHDACアイソフォームが活性化される正確なメカニズムについては、未だ不明の点も多い。

これまで、精力的なスクリーニングによってHDAC阻害活性を示す化合物が数多く得られているが、それらの中には顕著なIL-2の産生阻害活性を示す化合物が含まれており(例えば、I. Takahashi et al., The Journal of Antibiotics, 49:453-457(1995)参照)、シクロスポリンやタクロリムスを補完する免疫抑制剤の候補として注目されている。実際、このようにして選択された化合物の中にはインビボ(in vivo)において優れた免疫抑制作用を示すものが見出されている。FR225497は、その強力な免疫抑制作用によって、臓器移植片拒絶(organ transplant rejection)、自己免疫疾患(autoimmune diseases)の治療剤や予防剤として優れた効果を示すことが見出されているが(例えば、国際公開第WO 00/08048号参照)、それに加えて、遺伝子発現の異常によって発症すると考えられている他の数多くの疾患の治療剤や予防剤としての有用性も示唆されている。それらの疾患の中には、例えば、炎症性疾患(inflammatory disorders)、糖尿病(diabetes)、糖尿病性合併症(diabetic complications)、ホモ接合型サラセミア(homozygous thalassemia)、繊維症(fibrosis)、肝硬変(cirrhosis)、急性前骨髄球性白血病(acute promyelocytic leukaemia, APL)、原虫感染症(protozoal infection)、癌(tumor)などが含まれる。しかしながら、このような有用性にもかかわらず、これらのHDAC阻害活性を示す化合物の多くは、生体に投与した場合に、重篤な血小板減少の副作用を生じやすいという問題点があり、実際の治療薬としての利用を困難にしていた。

免疫抑制活性を示すHDAC阻害剤の多くが血小板減少の副作用を生じやすい原因については、現在のところ、まだ十分に解明されているわけではない。しかしながら、本発明者らは以前に、HDAC阻害剤の重篤な副作用である血小板減少作用については、GATA-1 (GATA-1 binding protein, GF-1, NF-E1, あるいはEryf1とも呼ばれている) 遺伝子の発現抑制が深く関わっていること、及び血小板抑制作用の強い化合物ほどGATA-1遺伝子の転写を強く抑制する傾向にあることを明らかにしている(特願2002-203901参照)。

10

20

30

40

50

GATA-1は、造血系遺伝子の転写制御領域に特徴的に存在する(A/T)GATA(A/G)コンセンサス配列を認識するDNA結合蛋白質である。このGATAモチーフ配列は、各種グロビン遺伝子のエンハンサー領域、 β -グロビン遺伝子のローカス制御領域(locus control regions, LCRs)、T細胞受容体 α -鎖、 β -鎖遺伝子のエンハンサー領域などの様々な制御領域やプロモーターで見出されている。また、GATA-1 mRNAは、成熟赤血球細胞・マスト細胞・巨核球などで高発現しており、多機能性前駆細胞や若齢マウスの精巣にもわずかに発現が見られる。さらに、GATA-1遺伝子を通常の方法でノックアウトしたマウスは、1次造血細胞の形成障害から胚発生の段階で致死的となる(例えば、Y. Fujiwara et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 93:12355-12358(1996)参照) 10

一方、巨核球系列のGATA-1遺伝子発現だけを選択的にノックアウトさせたマウスを作製することは可能であり、このようなマウスにおいては、血小板数が激減し、巨核球系細胞の正常な成熟も見られないことが判明している(例えば、R. A. Shivdasani et al., The EMBO Journal, 16:3965-3973(1997)参照)。

HDACには、数多くのアイソザイムが存在するが、それらの中には、阻害されると生体にとって重篤な副作用を生じるものがある。例えば、従来アイソザイム選択性のないHDAC阻害剤の投与によって、血小板減少の副作用が生じるが、本発明者らは、この作用が、赤血球系や巨核球系の細胞分化や成熟に決定的な役割を果たしているGATA-1 20
遺伝子の転写抑制作用によってもたらされている可能性を明らかにしており、これを利用して、血小板減少作用が少ない免疫抑制剤をスクリーニングする方法を以前に提供している(特願2002-203901参照)。しかし、このスクリーニング方法では、血小板減少作用が少ない免疫抑制剤をスクリーニングするために、HDAC阻害作用を有する化合物をスクリーニングした後に、血小板抑制作用を別途評価する必要があり、労力及び時間を要することとなっていたため必ずしも満足できるものではなかった。従って、HDAC阻害剤の中から免疫抑制剤を選択するには、免疫抑制効果にかかわる特定のアイソザイムは阻害するが、血小板減少作用等の副作用にかかわる他のアイソザイムを阻害しないものを簡便かつ短時間でスクリーニングする為の優れた方法を提供することが強く求められており、本発明はこのような課題の解決をその目的とするものである。 30

【発明の開示】

本発明者らは、IL-2遺伝子及びGATA-1遺伝子の転写抑制活性と各種HDACとの関連について鋭意研究する中で、各種HDACのうちHDAC4及びHDAC8のいずれか1つ、もしくはその両方を選択的に抑制すれば、GATA-1産生阻害活性をあまり抑制せずにIL-2産生を阻害できること、免疫担当細胞の増殖を阻害できること、及び血小板数をあまり減少させずに免疫を抑制できることを発見した。また、本発明者らは、HDAC4がN-CoRと複合体を形成すること、HDAC4とN-CoRとの複合体がさらにHDAC3と複合体を形成することを確認した。従って、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤、免疫担当細胞増殖阻害剤、又は血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を得るためには、各種HDACのうちHDAC4及び/又はHDAC8のみ 40
を選択的に抑制する化合物を選択すればよいこと、並びにHDAC4とN-CoRとの複合体の形成、必要に応じて、HDAC4とN-CoR・HDAC3複合体との高次複合体の形成を阻害すればよいことを着想し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下の発明に関する。

《1》HDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤を含むGATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤。

《2》HDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤。

《3》GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法であって、被験物質のHDAC4及び/又はHDAC8酵素阻害活性 50

を測定することを含む選択方法。

《4》血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験物質のHDAC4及び/又はHDAC8酵素阻害活性を測定することを含む選択方法。

《5》以下(i)(ii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法：

(i)被験物質のHDAC4及び/又はHDAC8酵素阻害活性を測定する、

(ii)被検物質のHDAC酵素阻害活性を測定する、ここで、該HDAC酵素阻害活性が、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6又はHDAC7酵素阻害活性からなる群より選択される1以上のHDAC酵素阻害活性である。

《6》以下(i)~(iii)の工程を含む、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法であって、該IL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤がHDAC4及び/又はHDAC8酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、《3》記載の方法： 10

(i)HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8の各遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(ii)当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、HDAC酵素活性を測定する；

(iii)HDAC4遺伝子又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的にHDAC酵素活性を抑制する被験物質を選択する。

《7》以下(i)~(iii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該免疫抑制剤がHDAC4及び/又はHDAC8酵素活性を選択的に阻害 20

(i)HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8の各遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(ii)当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、HDAC酵素活性を測定する；

(iii)HDAC4遺伝子又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的にHDAC酵素活性を抑制する被験物質を選択する。

《8》以下(i)~(iii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該免疫抑制剤がHDAC4及び/又はHDAC8酵素活性を選択的に阻害 30

(i)ヒト細胞から部分精製された酵素液を被験物質と共存させ、HDAC酵素活性を測定する；

(ii)HDAC4遺伝子及び/又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を被験物質と共存させ、HDAC酵素活性を測定する；

(iii)(i)と(ii)との酵素活性を比較し、HDAC4遺伝子及び/又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的にHDAC酵素活性を抑制する被験物質を選択する。

《9》以下(i)~(iii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験HDAC阻害剤のうち、HDAC4とN-CORとの複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする、方法：

(i)HDAC4遺伝子及びN-COR遺伝子を発現させて、酵素液を得る； 40

(ii)当該酵素液を被験HDAC阻害剤と共存させる；

(iii)(ii)で得られた酵素液と被験HDAC阻害剤の混合液においてHDAC4とN-CORとの複合体が形成されているか否かを解析する。

《10》以下(i)(ii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験HDAC阻害剤のうち、HDAC4蛋白質の少なくとも一部を含むHDAC4融合蛋白質と、N-COR蛋白質の少なくとも一部を含むN-COR融合蛋白質との複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする方法：

(i)該HDAC4融合蛋白質をコードする遺伝子、及びN-COR融合蛋白質をコードする遺伝子を細胞内で発現させる；

(ii)被験HDAC阻害剤が、該HDAC4融合蛋白質と該N-COR融合蛋白質との 50

複合体形成を阻害するか否かを解析する。

《11》以下(i)(ii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物の選択方法であって、被験HDAC阻害剤のうち、HDAC4及び/又はHDAC8の発現量を抑制するものを選択することによる方法：

(i) HDAC4及び/又はHDAC8を発現する細胞と被験HDAC阻害剤を共存させる；

(ii) 当該細胞におけるHDAC4及び/又はHDAC8発現量を測定する。

《12》以下(i)(ii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物の選択方法であって、被験HDAC阻害剤のうち、HDAC4及び/又はHDAC8とHDAC4及び/又はHDAC8特異的リガンドとの結合を選択的に阻害するものを選択することによる、方法：

(i) HDAC4及び/又はHDAC8遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(ii) 当該酵素液をHDAC4及び/又はHDAC8特異的リガンドと被験HDAC阻害剤と共存させ、HDAC4及び/又はHDAC8酵素とHDAC4及び/又はHDAC8特異的リガンドとの結合活性を測定する。

《13》以下(i)(ii)を少なくとも含む、HDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キット：

(i) HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6、HDAC7の各遺伝子を発現させて得られた酵素液；

(ii) HDAC4及び/又はHDAC8の各遺伝子を発現させて得られた酵素液；

《14》配列番号4又は配列番号6に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA。

《15》配列番号4又は配列番号6に記載のアミノ酸配列であることを特徴とするHDAC4変異体。

《16》有効量のHDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤を被験体(例えば任意の動物、好ましくは哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ等)、最も好ましくはヒト)に投与する工程を含む、GATA-1産生阻害活性が少ないIL-2産生及び/又は免疫担当細胞増殖の阻害方法。

《17》有効量のHDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤を被験体(上記と同様)に投与する工程を含む、血小板減少作用が少ない免疫の抑制方法。

《18》GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤の製造のためのHDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤の使用。

《19》血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の製造のためのHDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤の使用。

【図面の簡単な説明】

図1は、PCRによって増幅したヒトIL-2プロモーター領域における731塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBankのaccession番号X00695(全長6684bp)より入手し、その一部(配列番号29)を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例1で作製されたpGL3 IL2 proに含まれるIL-2プロモーター領域の塩基配列(配列番号23)である。

図2は、PCRによって増幅したヒトIL-2プロモーター領域における368塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBankのaccession番号X00695(全長6684bp)より入手し、その一部(配列番号31)を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例1で作製されたpGL3 IL2 pro 43に含まれるIL-2プロモーター領域の塩基配列(配列番号24)である。

図3は、PCRによって増幅したヒトGATA-1プロモーター領域における821塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBankのaccession番号AF196971(全長113853bp)より入手し、その一部(配列番号84)を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例2で作製されたpGL3-IEに含まれるGATA-1プロモーター領域の塩基配列、及びpGL3-HSI-IE Pr

10

20

30

40

50

oに含まれるGATA-1プロモーター領域の一部の塩基配列(配列番号25)である。

図4は、PCRによって増幅したヒトGATA-1プロモーター領域における637塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBankのaccession番号AF196971(全長113853bp)より入手し、その一部(配列番号85)を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例2で作製されたpGL3-HSI-IE Proに含まれるGATA-1プロモーター領域の一部の塩基配列(配列番号26)である。

図5は、IL-2転写活性(上段、n=3)及び細胞増殖度(下段)に関する各種HDACアイソザイム過剰発現の影響を示す。

図6は、GATA-1転写活性に対する各種HDACアイソザイム過剰発現の影響(n=2)を示す。

図7は、実施例6において作製されたHDAC4ドミナントネガティブ変異体の概要を示す。

図8は、HDAC4ドミナントネガティブ変異体(H802K H803L, H863L)の発現量依存的なIL-2転写抑制を示す。各グラフの上の記載は、トランスフェクションに使用したプラスミド量(n=3)を示す。

図9は、HDAC4ドミナントネガティブ変異体発現(H863L)によるJurkat細胞特異的な細胞増殖阻害を示す。

図10は、Jurkat細胞及びHEL細胞におけるHDAC4ドミナントネガティブ変異体(H802K H803L, H863L)発現によるIL-2及びGATA-1転写に対する影響を示す。上の図は、正常なHDAC1、HDAC3、HDAC4及びそれらの変異体に関しての、Jurkat細胞でのIL-2レポーター遺伝子アッセイの結果を示す。下の図は、正常なHDAC1、HDAC3、HDAC4及びそれらの変異体に関しての、HEL細胞でのGATA-1レポーター遺伝子アッセイの結果を示す。

図11は、PEAK Rapid細胞(Edge Biosystems)におけるHDAC4, HDAC5, HDAC7の発現、並びにHDAC4, HDAC5, HDAC7がN-CoR及びHDAC3と複合体を形成していることを示す。

図12は、HDAC4ドミナントネガティブ変異体(H863L)の複合体形成能について示す。

図13は、野生型HDAC4及びHDAC4ドミナントネガティブ変異体(H802K H803L, H863L)におけるHDAC活性を示す。

図14は、ツーハイブリッドシステムによるHDAC-4とN-CoRとの相互作用の概要を示す。上の図は、HDAC-4とN-CoRとが相互作用する場合の転写調節の様式を示し、下の図は、HDAC-4とN-CoRとが相互作用しない場合の転写調節の様式を示す。

図15は、ツーハイブリッドシステムによるHDAC-4とN-CoRとの相互作用を示す。

図16は、Jurkat細胞及びHEL細胞におけるHDAC4特異的siRNAによるIL-2及びGATA-1転写に対する影響を示す。左の図は、HDAC4特異的siRNAに関しての、Jurkat細胞でのIL-2レポーター遺伝子アッセイの結果を示す。右の図は、HDAC4特異的siRNAに関しての、HEL細胞でのGATA-1レポーター遺伝子アッセイの結果を示す。

発明の詳細な説明

以下に、本発明について詳細に説明する。

本発明は、HDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤を含むGATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤に関する。HDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤を含むGATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤は、例えば、後述する選択方法により入手することができる。また、後述する選択方法を当該分野で公知の方法と組み合わせ、HDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤を含むGATA-1産生阻害活性の少ないI

L - 2 産生阻害剤及び / 又は免疫担当細胞増殖阻害剤を入手することもできる。

「HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 選択的阻害剤」とは、HDAC 1 ~ 3 及び HDAC 5 ~ 7 の HDAC 酵素活性を抑制するよりも、HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 の HDAC 酵素活性をより抑制するものをいうが、HDAC 1 ~ 3 及び HDAC 5 ~ 7 の HDAC 酵素活性を抑制しないか又は実質的に抑制せず、かつ HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 の HDAC 酵素活性を抑制するものが好ましい。HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 選択的阻害剤としては、例えば、HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 に特異的なアンチセンス核酸、リボザイム、デコイ核酸、siRNA 及び抗体（例えば、単鎖抗体）、HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 のドミナントネガティブ変異体、これらをコードする核酸を含む発現ベクター、並びに後述の選択方法により得られる物質が挙げられる。

10

「GATA - 1 産生阻害活性」とは、GATA - 1 産生を抑制する活性である限り如何なる活性であってもよい。GATA - 1 産生抑制の機序としては、例えば、転写レベルでの抑制、GATA - 1 mRNA 分解の促進、翻訳レベルでの抑制等が挙げられる。GATA - 1 産生阻害活性は、当該分野で公知の方法により評価することができる。具体的には、GATA - 1 産生阻害活性は、後述するように GATA - 1 レポーター遺伝子を用いるレポーターアッセイにより、又は GATA - 1 を天然で発現している細胞株や初代培養細胞等において GATA - 1 mRNA 若しくは GATA - 1 蛋白質の発現量を測定して、評価することができる。また、ある化合物を添加して評価した際の GATA - 1 産生阻害活性が「少ない」とは、GATA - 1 産生を阻害する活性が比較対照とする化合物を添加した場合に比べて低いことをいい、例えば、当該 GATA - 1 産生阻害活性が少ないか否かは、GATA - 1 レポーター遺伝子を用いるアッセイにより評価することができる。比較対照する化合物としては、例えば、非特異的な HDAC 阻害剤であるトリコスタチン (trichostatin, TSA) が挙げられる。

20

「免疫担当細胞増殖阻害剤」とは、免疫担当細胞の増殖を阻害する活性を有するものである限り如何なる種類の活性を有するものであってもよい。細胞の増殖阻害の機序としては、例えば、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導等が挙げられる。免疫担当細胞の増殖阻害活性は、当該分野で公知の方法により評価することができる。具体的には、チミジンの取り込み活性、MTT 法等により評価することができる。ここで、「免疫担当細胞」とは、生体において免疫機能を担う細胞をいう。好ましくは、「免疫担当細胞」とは、抗体の産生能あるいは細胞性免疫反応を発現する能力を有するリンパ球や樹状細胞等をいい、より好ましくは T 細胞をいう。

30

「IL - 2 産生阻害剤」とは、IL - 2 産生阻害活性、即ち、IL - 2 産生を抑制する活性を有するものである限り如何なる種類の活性を有するものであってもよい。IL - 2 産生阻害の機序としては、例えば、転写レベルでの抑制、IL - 2 mRNA 分解の促進、翻訳レベルでの抑制等が挙げられる。IL - 2 産生阻害活性は、当該分野で公知の方法により評価することができる。具体的には、IL - 2 産生阻害活性は、後述する実施例に記載されたように IL - 2 レポーター遺伝子を用いるレポーターアッセイにより、又は IL - 2 を天然で発現している細胞株や初代培養細胞等において IL - 2 mRNA 若しくは IL - 2 蛋白質の発現量を測定して、評価することができる。

また、本発明は、HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤に関する。HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤は、例えば、後述する選択方法により入手することができる。また、後述する選択方法を当該分野で公知の方法と組み合わせて、HDAC 4 及び / 又は HDAC 8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を入手することもできる。

40

「血小板減少作用」とは、血小板数を低下させる作用をいい、当該血小板減少作用は、例えば、実験動物への化合物の投与等による当該分野で公知の方法によって直接的に確認することができる。また、血小板減少作用と GATA - 1 産生阻害活性との間には相関性があることが知られているため、血小板減少作用は、GATA - 1 産生阻害活性を指標にして間接的に確認することもできる。また、ある化合物や薬剤について血小板減少作用の

50

「少ない」とは、当該化合物や当該薬剤をヒトまたは実験動物等に投与した際に、血小板数を減少させる作用が、比較対照とする化合物を投与した場合に比べて低いことをいい、例えば、上述したような方法によってGATA-1産生阻害活性が少ないか否かを評価することにより、血小板減少作用が少ないか否かを確認することもできる。比較対照する化合物としては、例えば、オキサムフラチン(Oxamflatin)が挙げられる。

「免疫抑制剤」とは、免疫抑制を誘発する薬剤をいい、例えば、当該免疫抑制剤としては、IL-2産生を抑制する活性を有するものが挙げられる。従って、例えば、上述したような方法を用いてIL-2転写抑制活性を有するか否かを評価することにより、当該免疫抑制剤を入手することができる。

また、本発明は、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験物質のHDAC4及び/又はHDAC8酵素阻害活性を測定することを含む選択方法に関する。 10

具体的には、本発明は、(i)被検物質のHDAC4及び/又はHDAC8酵素阻害活性を測定し、(ii)被検物質のHDAC酵素阻害活性(ここで、HDAC酵素阻害活性は、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6又はHDAC7酵素阻害活性からなる群より選択される1以上のHDAC酵素阻害活性である)を測定することを含む、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。本方法の工程(ii)では、被検物質の存在下、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6又はHDAC7酵素阻害活性からなる群より選択される1以上のHDAC酵素阻害活性が測定されるが、好ましくはHDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6又はHDAC7酵素阻害活性の全てが測定される。なお、本方法は、(iii)(i)と(ii)との結果に基づき、被検物質がHDAC4及び/又はHDAC8酵素活性を選択的に阻害するか否かを評価する工程をさらに含んでもよい。 20

より具体的には、本発明は、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該IL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤がHDAC4及び/又はHDAC8酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする方法に関する。1実施態様において、上記方法は、(i)HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8の各遺伝子を発現させて、酵素液を得た後に、(ii)当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、HDAC酵素活性を測定し、(iii)HDAC4遺伝子又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的にHDAC酵素活性を抑制する被験物質を選択することを特徴とする。 30

別の実施態様において、上記方法は、(i)ヒト細胞から部分精製された酵素液を被験物質と共存させ、HDAC酵素活性を測定し、(ii)HDAC4遺伝子及び/又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を被験物質と共存させ、HDAC酵素活性を測定し、(iii)(i)と(ii)との酵素活性を比較し、HDAC4遺伝子及び/又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的にHDAC酵素活性を抑制する被験物質を選択することを特徴とする。この方法のうち(i)で用いられるヒト細胞としては、ヒト由来の細胞株であれば特に制限されないが、好ましくは、上述の免疫担当細胞に由来する細胞株、最も好ましくは、Jurkat細胞(ATCC受託番号TIB-152)が用いられる。 40

上述の「被検物質」としては、本発明の方法による測定系にかけることができる候補物質であれば特に限定されず、低分子有機化合物、低分子無機化合物、蛋白質や核酸を含む高分子化合物、糖類等のあらゆる化合物を含み、またそれらの混合液、天然物や合成物、動植物や菌類、藻類、微生物からの抽出液の全てを含む。また、「被検物質」としては、例えば、HDAC阻害剤(例えば、国際公開第WO 02/085883号、同第WO 02/085400号、同第WO 02/076941号、同第WO 02/06277 50

3号、同第WO 02/46129号、同第WO 02/07722号、同第WO 02/06307号、同第WO 01/70675号、同第WO 01/38322号、同第WO 01/16106号、同第WO 00/71703号、同第WO 00/21979号、同第WO 00/08048号；公開特許公報特開2001-348340、特開平11-302173；米国特許公開公報US 2002/0120099、US 2002/0115826；米国特許第6,638,530号、同第6,541,661号、同第6,399,568号を参照)を使用することができる。なお、「被検物質」は、既知の化合物であっても、新たに発見若しくは合成された化合物であってもよい。

「HDAC阻害剤」とは、HDAC酵素活性を阻害する化合物、即ち、HDAC酵素阻害活性を有する化合物をいう。

「HDAC酵素活性」は、アセチル化された蛋白質、例えば、ヒストンのリジン残基からアセチル基を除去する活性(即ち、脱アセチル化活性)をいい、特定のHDACアイソザイムによる脱アセチル化活性であっても、不特定の1又は2以上のHDACアイソザイムによる脱アセチル化活性であってもよい。一方、「HDAC4酵素活性」とは、HDAC4による脱アセチル化活性をいい、「HDAC8酵素活性」とは、HDAC8による脱アセチル化活性をいう。HDAC1酵素活性、HDAC2酵素活性、HDAC3酵素活性、HDAC4酵素活性、HDAC5酵素活性、HDAC6酵素活性、HDAC7酵素活性についても同義である。HDAC酵素活性は、当該分野で公知の方法によって、被検物質の存在下/非存在下、各HDAC酵素を含有する酵素液(以下、必要に応じて「酵素液」と省略する)をHDAC酵素の基質と反応させることにより測定することができる。

「HDAC酵素阻害活性」は、蛋白質のリジン残基の脱アセチル化を抑制する活性をいい、特定のHDACアイソザイムによる脱アセチル化を特異的に抑制する活性であっても非特異的に抑制する活性であってもよい。一方、「HDAC4酵素阻害活性」とは、HDAC4による脱アセチル化を抑制する活性をいい、「HDAC8酵素阻害活性」とは、HDAC8による脱アセチル化を抑制する活性をいう。HDAC1酵素阻害活性、HDAC2酵素阻害活性、HDAC3酵素阻害活性、HDAC4酵素阻害活性、HDAC5酵素阻害活性、HDAC6酵素阻害活性、HDAC7酵素阻害活性についても同義である。

HDAC酵素活性の測定において使用される基質としては、当該分野で公知の基質を使用することができるが、代表的には、 $[^3\text{H}]$ アセチル標識ヒストン、蛍光標識アセチル化ペプチド等を使用することができる。例えば、基質として $[^3\text{H}]$ アセチル標識ヒストンを使用する場合、 $[^3\text{H}]$ アセチル標識ヒストンは、Jurkat細胞から得ることができる。具体的には、以下の通りである。10% FBS、ペニシリン(50ユニット/ml)及びストレプトマイシン(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を補充したRPMI-1640培地において、 1×10^8 のJurkat細胞を、5mM酪酸ナトリウムの存在下、300MBq $[^3\text{H}]$ 酢酸ナトリウムと30分間インキュベートし(5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$)、遠心チューブ(50ml)に回収し、遠心分離(1000rpm、10分間)により収集し、リン酸緩衝化生理食塩水で1回洗浄する。洗浄した細胞を氷冷した溶解緩衝液(10mM Tris-HCl、50mM亜硫酸水素ナトリウム、1% Triton X-100、10mM MgCl_2 、8.6% スクロース、pH6.5)15mlに懸濁する。ダウンズホモジナイゼーション(30ストローク)後に、核を遠心分離(1000rpm、10分間)により収集し、溶解緩衝液15mlで3回洗浄し、次に氷冷した洗浄緩衝液(10mM Tris-HCl、13mM EDTA、pH7.4)15mlで1回洗浄する。ミキサーを使用して、氷冷水6mlにペレットを懸濁させ、この懸濁液に H_2SO_4 68mlを0.4Nの濃度になるように加える。4 $^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした後、懸濁液を遠心分離(15,000rpm、5分間)し、その上清をアセトン60mlと混合する。最終的に、-20 $^\circ\text{C}$ で終夜インキュベートした後、凝集物を回収することにより $[^3\text{H}]$ アセチル標識ヒストンを得ることができる。 $[^3\text{H}]$ アセチル標識ヒストンを得る方法については、例えば、国際公開第WO00/08048号、Yoshida, M. et al., J. Biol. Chem., 265:17174-17179(1990)等を参照のこと。このようにして得られた $[^3\text{H}]$ アセチル標識ヒストンは、適当な緩

10

20

30

40

50

衝液に溶解させそのまま直ぐに用いてもよいし、あるいは直ぐに使用しない場合には、溶液状態で凍結保存しても冷蔵で保存してもよく、又は乾燥させて固体状態で凍結保存しても冷蔵で保存してもよい。

「各遺伝子を発現させる」ことは、プロモーター配列を有する発現ベクターに当該遺伝子を組み込み、当該遺伝子が組み込まれた発現ベクターを細胞に導入して培養すること等によって実施されうる。使用するプロモーター、発現ベクター等は、発現に用いる宿主細胞によって様々に異なるが、通常の専門知識を有する当業者であれば、容易に最適の組合せを市販品の中から見出し得る。あるいは、「各遺伝子を発現させる」ことは、当該遺伝子をSP6ファージ、T7ファージ等のプロモーター配列を有する発現ベクターに導入し、*in vitro* transcription/translation法により試験管内で反応させることによっても実施されうる。通常の実験知識を有する当業者であれば、この方法により容易に当該各遺伝子の転写産物及び蛋白質を合成することができる。

本発明で使用される遺伝子を細胞に導入する方法としては、リン酸カルシウム法、リポソーム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法(electroporation法、電気穿孔法)等の当該分野で公知の形質転換方法を用いることができ、特に限定されない。

本発明で使用される遺伝子が導入される細胞としては、特に明記されない限り、発現ベクターに挿入されている遺伝子が発現される細胞であれば限定されず、上述したヒト細胞を含む哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母、大腸菌等を用いることができる。

「酵素液」とは、HDAC酵素活性を有する細胞破砕液又は反応液から抽出されるHDAC酵素活性含有画分をいい、HDAC酵素活性を測定できる程度にHDAC酵素が精製されているものであれば、HDAC酵素が部分精製されたものであっても高純度に精製されたものであってもよい。HDAC酵素活性を有する細胞破砕液は、天然でHDAC酵素を発現している細胞、または各HDAC遺伝子を過剰発現させた細胞から入手することができる。天然でHDAC酵素を発現している細胞から酵素液を得るためには、例えば、当該細胞を培養し、その培養細胞の破砕液からHDAC酵素活性を有する画分を抽出すればよい。また、各HDAC遺伝子を過剰発現させた細胞から酵素液を得るためには、例えば、各HDAC遺伝子を発現ベクターに組み込み、該発現ベクターを細胞に導入し、得られた細胞を培養し、その培養細胞の破砕液からHDAC酵素活性を有する画分を抽出すればよい。一方、HDAC酵素活性を有する反応液は、例えば、適当なベクターに連結した各HDAC遺伝子から、*in vitro* transcription/*in vitro* translation法を用いて各HDACの転写産物及び蛋白質を合成することにより得ることができる。

HDAC酵素の「部分精製」とは、HDAC酵素活性を測定できる程度にHDAC酵素を精製することをいい、当該分野で公知の方法、例えば、国際公開第W000/08048号、Yoshida, M. et al., J. Biol. Chem. 265: p. 17174-17179 (1990)記載の方法等により行なうことができる。また、部分精製されたHDAC酵素を、当該分野で公知の他の精製法によりさらに高純度に精製することもできる。部分精製としては、例えば、以下の精製法を用いることができる。最初に、 5×10^8 のJurkat細胞を、40mlのHDAC緩衝液(組成: 15mMリン酸カリウム、5%グリセロール及び0.2mM EDTA、pH7.5)40mlに懸濁する。次いで、懸濁液をホモジナイズした後、遠心分離(35,000 x g, 10分間)によって核を回収し、得られた核を、1M(NH₄)₂SO₄を加えたHDAC緩衝液20ml中でホモジナイズする。次いで、ホモジネートを超音波処理し、遠心分離(35,000 x g, 10分間)によって清澄化する。次に、(NH₄)₂SO₄の濃度を3.5Mまで上昇させることにより、デアセチラーゼを沈殿させる。続いて、沈殿した蛋白質をHDAC緩衝液10mlに溶解し、それをHDAC緩衝液4L中で透析する。透析後のサンプル溶液を、HDAC緩衝液で平衡化したDEAE-セルロース(Whatman DE52)カラム(25 x 85mm)にロードし、線形勾配(0~0.6M)のNaCl溶液300mlにより溶出させる。その結果、HDAC酵素活性は、0.3~0.4M NaCl

10

20

30

40

50

溶出画分において単一ピークとして見出される。

H D A C 酵素活性は、当該分野で公知の方法によって測定される。例えば、基質として [³ H] アセチル標識ヒストンを使用する場合には、[³ H] アセチル標識ヒストン 1 0 μ l を酵素液 9 0 μ l に加え、混合液を 2 5 で 3 0 分間インキュベートする。反応を、塩酸 1 0 μ l を加えることにより停止し、放出された [³ H] 酢酸を酢酸エチル 1 m l で抽出する。最終的に、溶媒層 0 . 9 m l をトルエンシンチレーション溶液に移し、この溶液の放射活性を測定することによって、H D A C 酵素活性を測定することができる。被検物質の共存下で各酵素液の H D A C 酵素活性を測定する場合には、被検物質は、[³ H] アセチル標識ヒストン 1 0 μ l と酵素液 9 0 μ l との混合液の調製前後に加えて、反応を開始させればよい。なお、H D A C 酵素活性の測定の詳細については、[³ H] アセチル標識ヒストンを基質とする場合には、例えば、国際公開第 W O 0 0 / 0 8 0 4 8 号 ; Y o s h i d a , M . e t a l . , J . B i o l . C h e m . , 2 6 5 : 1 7 1 7 4 - 1 7 1 7 9 (1 9 9 0) 等、蛍光標識アセチル化ペプチドを基質とする場合には、例えば、国際公開第 W O 0 1 / 0 4 0 5 0 6 号等を参照のこと。

10

上述した方法では、H D A C 4 遺伝子又は H D A C 8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に H D A C 酵素活性を抑制する被験物質が好ましくは選択されるが、H D A C 1 ~ 3 及び H D A C 5 ~ 7 の H D A C 酵素活性を抑制するよりも H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 の H D A C 酵素活性をより抑制する被験物質を選択してもよい。より好ましくは、H D A C 1 ~ 3 及び H D A C 5 ~ 7 の H D A C 酵素活性を抑制しないか又は実質的に抑制せず、かつ H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 の H D A C 酵素活性を抑制する被験物質が選択される。

20

また、本発明は、G A T A - 1 産生阻害活性の少ない I L - 2 産生阻害剤及び / 又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験 H D A C 阻害剤のうち、H D A C 4 と N - C o R との複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする方法に関する。例えば、この方法は、(i) H D A C 4 遺伝子及び N - C o R 遺伝子を発現させて、酵素液を得た後に、(i i) 当該酵素液を被験 H D A C 阻害剤と共存させ、(i i i) (i i) で得られた酵素液と被験 H D A C 阻害剤の混合液において H D A C 4 と N - C o R との複合体が形成されているか否かを解析することを特徴する。尚、この方法において、H D A C 4 遺伝子及び N - C o R 遺伝子に加え、さらに H D A C 3 遺伝子を発現させて得られる酵素液を用いてもよい。この場合、被験 H D A C 阻害剤の存在下において、H D A C 4 と N - C o R 及び H D A C 3 との間で高次複合体を形成しているか否かが解析される。上記方法の (i i i) において、複合体が形成されているか否かを解析する方法としては、例えば、表面プラズモン共鳴を利用した解析法、抗体を利用した解析法 (例えば、ウエスタンブロッティング) 等の当該分野で公知の方法が挙げられる。

30

抗体を利用した解析法、例えば、ウエスタンブロッティングにおいて、2 次抗体を標識するにあたり使用される標識物質としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、³ ² P、¹ ² ⁵ I 等の放射性物質、化学発光物質等が挙げられる。

また、H D A C 4 と N - C o R との複合体形成を特異的に阻害する G A T A - 1 産生阻害活性の少ない I L - 2 産生阻害剤及び / 又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択するために、当該分野で公知のツーハイブリッドシステムに基づく方法を用いることもできる。例えば、この目的でツーハイブリッドシステムを用いる場合、(i) H D A C 4 蛋白質の少なくとも一部を含む H D A C 4 融合蛋白質をコードする遺伝子、N - C o R 蛋白質の少なくとも一部を含む N - C o R 融合蛋白質をコードする遺伝子を細胞内で発現させ、(i i) 被験物質 (好ましくは、被験 H D A C 阻害剤) が、H D A C 4 融合蛋白質と N - C o R 融合蛋白質との複合体形成を阻害するか否かを解析することによって、H D A C 4 融合蛋白質と N - C o R 融合蛋白質との複合体形成を特異的に阻害する被験物質が選択される。

40

H D A C 4 融合蛋白質は、H D A C 4 蛋白質のうち、N - C o R と相互作用する領域を

50

含んでいけばよいが、HDAC4蛋白質全体を含んでいてもよい。同様に、N-COR融合蛋白質は、N-COR蛋白質のうち、HDAC4と相互作用する領域（例えば、後述のRD3）を含んでいけばよいが、N-COR蛋白質全体を含んでいてもよい。また、HDAC4融合蛋白質及びN-COR融合蛋白質は、それぞれ、HDAC4蛋白質及びN-COR蛋白質の一部又は全てに加え、転写調節因子由来のDNA結合ドメイン（例えば、GAL4 DNA結合ドメインなど）又は転写活性化ドメイン（例えば、VP16活性化ドメインなど）を更に含む。但し、HDAC4融合蛋白質がDNA結合ドメインを含む場合には、N-COR融合蛋白質は転写活性化ドメインを含むことが必要とされ、一方、HDAC4融合蛋白質が転写活性化ドメインを含む場合には、N-COR融合蛋白質はDNA結合ドメインを含むことが必要とされる。

10

融合蛋白質間で複合体が形成されているか否かは、該融合蛋白質が含むDNA結合領域が結合するプロモーターの下流にある遺伝子の発現量により確認することができる。即ち、融合蛋白質間で複合体が形成されている場合には、当該遺伝子によりコードされるmRNAや蛋白質の発現量や、当該遺伝子の上流にあるプロモーターを含むレポーター遺伝子の発現量が増大し、一方、融合蛋白質間で複合体が形成されていない場合には、当該遺伝子がコードするmRNAや蛋白質の発現量や、上記プロモーターを含むレポーター遺伝子の発現量は変動しない。

また、被験物質（好ましくは、被験HDAC阻害剤）が、HDAC4融合蛋白質とN-COR融合蛋白質との複合体形成を阻害するか否かは、被検物質を共存させることによって、該融合蛋白質が含むDNA結合領域が結合するプロモーターの下流にある遺伝子の発現量が減少するか否かにより評価することができる。即ち、(a) 当該遺伝子によりコードされるmRNAや蛋白質の発現量や当該遺伝子の上流にあるプロモーターを含むレポーター遺伝子の発現量を、被検物質の非共存下で測定し、(b) 当該mRNA、蛋白質又はレポーター遺伝子の発現量を、被検物質の共存下で測定し、(c) (a)の発現量と(b)の発現量とを比較すればよく、(b)の発現量が(a)の発現量よりも低い場合に、当該被検物質は、HDAC4融合蛋白質とN-COR融合蛋白質との複合体形成を阻害する物質として選択される。なお、被験物質がHDAC4融合蛋白質とN-COR融合蛋白質との複合体形成を阻害するか否かは、アッセイの簡便性、感度等の観点から、好ましくは、レポーター遺伝子の発現量を測定して評価される。

20

また、本発明は、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害活性及び/又は免疫担当細胞増殖阻害活性を有する化合物、又は血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物であって、被験HDAC阻害剤のうち、HDAC4及び/又はHDAC8の発現量を抑制するものを選択することによる方法に関する。この方法は、(i) HDAC4及び/又はHDAC8を発現する細胞と被験HDAC阻害剤を共存させ、(ii) 当該細胞におけるHDAC4及び/又はHDAC8発現量を測定することを特徴とする。具体的には、この方法は、後述するGATA-1 mRNA、GATA-1蛋白質又はGATA-1レポーター遺伝子の発現量の測定方法と同様の方法によって行なうことができる。

30

また、本発明は、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害活性を有する化合物、又は血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物の選択方法であって、被験HDAC阻害剤のうち、HDAC4及び/又はHDAC8とHDAC4及び/又はHDAC8特異的リガンドとの結合を選択的に阻害するものを選択する方法に関する。この方法は、(i) HDAC4及び/又はHDAC8遺伝子が発現させて、酵素液を得た後に、(ii) 当該酵素液をHDAC4及び/又はHDAC8特異的リガンドと被験HDAC阻害剤と共存させ、HDAC4及び/又はHDAC8酵素とHDAC4及び/又はHDAC8特異的リガンドとの結合活性を測定することを特徴とする。

40

「HDAC4及び/又はHDAC8特異的リガンド」とは、HDAC4及び/又はHDAC8に特異的に結合する物質の中で、HDAC1~3及びHDAC5~7よりもHDAC4及び/又はHDAC8に対する結合活性がより強い物質をいう。これらの物質の中には、各酵素活性を促進するものや逆に阻害するもの等が含まれるが、それらに限定されない。「HDAC4及び/又はHDAC8特異的リガンド」としては、HDAC1~3及び

50

H D A C 5 ~ 7 に対する結合活性が弱い、又は結合活性が実質的に存在せず、かつ H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 に対する結合活性が強い低分子物質が好ましい。

また、上記方法における工程 (i i) では、「 H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 特異的リガンド」が好ましく用いられるが、「 H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 非特異的リガンド」も用いることができる。「 H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 非特異的リガンド」とは、 H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 に対する結合活性よりも H D A C 1 ~ 3 及び H D A C 5 ~ 7 の H D A C に対する結合活性がより強い物質、あるいは H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 と H D A C 1 ~ 3 及び H D A C 5 ~ 7 への結合活性がほぼ同等である物質をいう。本発明において、「 H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 特異的リガンド」及び「 H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 非特異的リガンド」をまとめて「 H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 10
リガンド」と呼ぶ場合もある。

上記方法における工程 (i i) では、 H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 酵素と H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 特異的リガンドとの結合活性が、被験 H D A C 阻害剤の共存下で測定される。結合活性は、例えば、バインディングアッセイ (b i n d i n g a s s a y)、質量分析法等の当該分野で公知の方法を用いることにより測定することができる。上記方法により、 H D A C 4 及び / 又は H D A C 8 特異的リガンドを競合的に阻害する物質を入手することができる。

本発明では、 H D A C 4 として、好ましくは、ヒト由来の H D A C 4 が用いられる。具体的には、 H D A C 4 とは、例えば、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質自体およびその類縁体であって、 H D A C 酵素活性を有するものをいう (例えば、 G e n B a n k 登録番号 A F 1 3 2 6 0 7 の塩基配列がコードする蛋白質)。 H D A C 4 類縁体としては、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 1 又は 2 個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加された変異体、糖鎖付加体等が包含される。また、 H D A C 4 類縁体として、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と、 7 0 % 以上、好ましくは 8 0 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。アミノ酸配列の相同性の程度は、例えば、 N C B I (T h e N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n) において、対象となるアミノ酸配列と対比すべきアミノ酸配列との間で B L A S T をデフォルト設定にて用いることにより決定することができる。 H D A C 4 に関する詳細については、例えば、国際公開第 W O 0 0 / 1 0 5 8 3 号を参照のこと。 20
30

同様に、本発明では、 H D A C 8 として、好ましくは、ヒト由来の H D A C 8 が用いられる。具体的には、 H D A C 8 とは、例えば、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質自体およびその類縁体であって、 H D A C 酵素活性を有するものをいう (例えば、 G e n B a n k 登録番号 H S A 2 7 7 7 2 4 の塩基配列がコードする蛋白質)。 H D A C 8 類縁体として、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列において 1 又は 2 個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加された変異体、糖鎖付加体等が包含される。また、 H D A C 8 類縁体としては、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列と、 7 0 % 以上、好ましくは 8 0 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。 H D A C 8 に関する詳細については、例えば、 J o s e p h J . B U G G Y e t a l . , B i o c h e m i c a l J o u r n a l 3 5 0 : 1 9 9 - 2 0 5 (2 0 0 0) を参照のこと。 40

また、本発明では、 N - C o R として、好ましくは、ヒト由来の N - C o R が用いられる。具体的には、 N - C o R とは、例えば、配列番号 2 2 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質自体およびその類縁体であって、 H D A C 4 や H D A C 3 と複合体を形成できるものをいう (例えば、 G e n B a n k 登録番号 A F 0 4 4 2 0 9 の塩基配列がコードする蛋白質)。 N - C o R 類縁体としては、配列番号 2 2 で示されるアミノ酸配列において 1 又は 2 個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加された変異体、糖鎖付加体等が包含される。また、 N - C o R 類縁体として、配列番号 2 2 で示されるアミノ酸配列と、 7 0 % 以上、好ましくは 8 0 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。また、本発明では、 N - 50

C o Rは、H D A C 4（必要に応じてH D A C 4及びH D A C 3の両方）と複合体を形成できればよい。このようなN - C o Rとして、上記に挙げたものの他に、例えば、M a t t h e w G . G u e n t h e r e t a l . , M o l e c u l a r a n d C e l l u l e r B i o l o g y , 2 1 (1 8) : 6 0 9 1 - 6 1 0 1 (2 0 0 1) 等に開示されるN - C o R変異体等も用いることができる。

また、本発明では、H D A C 3として、好ましくは、ヒト由来のH D A C 3が用いられる。具体的には、H D A C 3とは、例えば、配列番号16で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質自体およびその類縁体であって、H D A C 酵素活性を有するもの、又はH D A C 4（必要に応じてH D A C 4 - N - C o R複合体）と結合しうるものをいう（例えば、G e n B a n k 登録番号U 6 6 9 1 4の塩基配列がコードする蛋白質）。H D A C 3類縁体として、配列番号16で示されるアミノ酸配列において1又は2個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加された変異体、糖鎖付加体等が包含される。また、H D A C 3類縁体として、配列番号16で示されるアミノ酸配列と、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。また、H D A C 3とN - C o Rとの複合体（必要に応じて、H D A C 3とH D A C 4 - N - C o R複合体との高次複合体）の解析においては、H D A C 3は、H D A C 4（必要に応じて、H D A C 4 - N - C o R複合体）との結合能さえ維持していれば必ずしもH D A C 酵素活性を有しなくともよい。H D A C 3に関する詳細については、例えば、M o l e c u l a r C e l l , 9 : 4 5 - 5 7 (J a n u a r y , 2 0 0 2)、及びM a t t h e w G . G u e n t h e r e t a l . , M o l e c u l a r a n d C e l l u l e r B i o l o g y , 2 1 (1 8) : 6 0 9 1 - 6 1 0 1 (2 0 0 1) 等を参照のこと。

さらに、本発明では、H D A C 1 ~ 2、H D A C 5 ~ 7として、好ましくは、ヒト由来のものが用いられる。具体的には、H D A C 1 ~ 2、H D A C 5 ~ 7は、それぞれ、G e n B a n k 登録番号D 5 0 4 0 5の塩基配列（H D A C 1）、G e n B a n k 登録番号H S U 3 1 8 1 4の塩基配列（H D A C 2）、G e n B a n k 登録番号A F 1 3 2 6 0 8の塩基配列（H D A C 5）、G e n B a n k 登録番号A F 1 3 2 6 0 9の塩基配列（H D A C 6）、G e n B a n k 登録番号A F 2 3 9 2 4 3の塩基配列（H D A C 7）がコードする蛋白質自体およびその類縁体であって、H D A C 酵素活性を有するものである。また、H D A C 1 ~ 2、H D A C 5 ~ 7類縁体としては、それぞれ、上記H D A C 1 ~ 2、H D A C 5 ~ 7に対応するアミノ酸配列において1又は2個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加された変異体、糖鎖付加体等が包含される。また、H D A C 1 ~ 2、H D A C 5 ~ 7類縁体として、それぞれ、上記H D A C 1 ~ 2、H D A C 5 ~ 7に対応するアミノ酸配列と、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。

さらに、本発明は、上述のようにして選択された血小板減少作用の少ない免疫抑制剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤について、G A T A - 1産生阻害活性の程度をさらに確認することにより、血小板減少作用の少ないH D A C 4及び/又はH D A C 8選択的阻害剤を選択する方法に関する。G A T A - 1産生阻害活性の程度は、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の共存下及び/又は非共存下、例えば、G A T A - 1を天然で発現している細胞株や初代培養細胞等の細胞においてG A T A - 1 m R N A、G A T A - 1蛋白質又はG A T A - 1レポーター遺伝子の発現量を測定することによって評価することができるが、アッセイの簡便性、感度等の観点から、G A T A - 1レポーター遺伝子の発現量を測定することが好ましい。

上記方法において、G A T A - 1産生阻害活性を測定するために用いられる試験細胞としては、G A T A - 1を天然で発現している細胞株や初代培養細胞等を用いることができる。特定の細胞株や初代培養細胞がG A T A - 1を天然で発現しているか否かは、それら細胞におけるG A T A - 1 m R N A又は蛋白質の発現を当該分野で公知の方法により確認することにより評価できる。また、上記方法で用いられる試験細胞としては、巨核球系列の細胞の状態を実質的に反映した細胞も好ましい。巨核球系列の細胞の状態を実質的に

10

20

30

40

50

反映した細胞株としては、巨核球系列に由来する細胞であれば、特に限定されないが、例えば、ヒト由来のHEL細胞（受託番号JCRB0062, Japanese Collection of Research Bioresources）を用いることができる。

GATA-1 mRNA若しくはGATA-1蛋白質の発現量によりHDAC4及び/又はHDAC8阻害剤のGATA-1産生阻害活性を評価する場合において、試験細胞をHDAC4及び/又はHDAC8阻害剤と共存させる方法としては、細胞の培養液にHDAC4及び/又はHDAC8阻害剤を添加して、培養すればよい。

GATA-1レポーター遺伝子を用いるレポーターアッセイによりHDAC4及び/又はHDAC8阻害剤のGATA-1産生阻害活性を評価する場合において、試験細胞をHDAC4及び/又はHDAC8阻害剤と共存させる方法としては、エレクトロポレーション等の遺伝子導入法により細胞にGATA-1レポーター遺伝子を導入する前後に、細胞の培養液にHDAC4及び/又はHDAC8阻害剤を添加すればよい。好ましくは、GATA-1レポーター遺伝子を導入後、培養液にHDAC4及び/又はHDAC8阻害剤を添加して、さらに培養すればよい。

GATA-1 mRNAの発現量は、例えば、試験細胞からtotal RNAをそれぞれ調製し、競合的RT-PCRやリアルタイムRT-PCR等の当該分野で公知の定量的RT-PCR等によってGATA-1 mRNAの発現量を比較することにより確認することができる。

GATA-1蛋白質の発現量は、例えば、HDAC4及び/又はHDAC8阻害剤の共存下及び非共存下におかれた細胞から抽出液を調製し、抗GATA-1抗体及び、標識された2次抗体を用いて測定することができる。その手法としては、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（E. Engvall et al., Methods in Enzymol., 70: 419-439 (1980)）、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、凝集法、オクタロニー（Ouchterlony）等の、一般の免疫化学的測定法において使用されている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁-第53頁、昭和57年3月5日）を利用することができるが、感度、簡便性等の点からはELISA法が好ましい。上記2次抗体を標識するにあたり使用される標識物質としては、上述したものと同様のものを用いることができる。

また、GATA-1レポーター遺伝子の発現量は、GATA-1レポーター遺伝子を用いるレポーターアッセイにより評価することができる。「GATA-1レポーター遺伝子」とは、GATA-1遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子とを人工的に連結させたDNA構築物をいう。GATA-1遺伝子の転写制御領域としては、ヒトGATA-1遺伝子（GenBank Accession Number: AF196971）のIEプロモーター領域及びその上流約3.5 kb付近に離れて存在するHSI領域（DNase I高感受性領域）の両方を含むDNA断片が用いられる。本発明の目的に必須な転写制御領域の範囲としては、単に転写活性を保持しているのみならず、巨核球系細胞における天然のGATA-1遺伝子の転写制御様式を実質的に反映したものであることが望ましい。

GATA-1遺伝子のプロモーターについては、IEプロモーター及びITプロモーターの少なくとも2種類が存在することが知られている。このうち、HDAC阻害剤による血小板減少作用との関連においては、巨核球系細胞における転写制御と密接に関連していることが判明しているIEプロモーターの機能が重要と推定されているため、その制御領域を用いることが好ましい。

IEプロモーターによる転写制御には、転写開始点のすぐ上流約0.7 kb内に存在する配列とさらに上流に存在するHSI領域（DNase I高感受性領域）の両方が重要である。HSI領域の5'側には、2個のCACCC siteが存在し、それから約50塩基対離れて、GATA結合部位（GATA binding site）とE-box

10

20

30

40

50

モチーフが約10塩基対離れて隣り合っている。このうちのGATA結合部位を壊すような変異を導入すると、赤血球や巨核球特異的な発現が見られなくなることが知られている(P. Vyas et al., Development 126; 2799-2811 (1999))。また、このGATA-E-boxモチーフのさらに3'側には、特徴的なパ lindローム配列であるCTGTGGCCACAG配列(配列番号86)及び、GCに富む領域が存在する。GCに富む領域の中には、転写因子のETSの結合部位に見られるGGA配列が存在する。これらの配列を含むGATA-1 HSI領域のうち、5'側のCAC siteを欠損させても、赤血球や巨核球特異的な発現が見られるが、GATA-E-box motifまで欠損させると、発現は消失する。3'側については、最大でもE-boxの下流約250塩基対までを含めば、エンハンサーとして機能することが報告されている。従って、以上のような必須の配列部位をすべて含んでいるならば、実際にはどのような長さの配列でもかまわないが、たとえば、ヒトGATA-1遺伝子のIEプロモーターによる転写開始点近傍(-789から+30:転写開始点を+1とする)819塩基対を含む領域と転写開始点上流のHIS領域として637塩基対(-3769から-3133)を含む領域を人工的に連結させたものを用いることができる。

GATA-E-box motif等の必須な配列部位については、通常の組換えDNA実験の手法により、それらの必須配列を複数個タンデムに重複させた人工的なDNA構築物を作製することが可能である。このような人工的構築物を天然の配列と入れ換えて用いることにより、当該転写制御領域の転写誘導活性を増強させることができる場合がある。

なお、「レポーター遺伝子」とは、遺伝子発現の目印となる特異的蛋白質をコードする構造遺伝子領域と下流の非翻訳領域(3'-non coding region)から構成され、構造遺伝子上流側に本来存在する転写制御領域をすべて欠失したものをいう。遺伝子発現の目印となる特異的蛋白質をコードする構造遺伝子領域については、外来遺伝子断片と人工的に連結させて細胞に導入することにより、当該外来遺伝子断片に含まれる転写制御領域からの遺伝子発現をそのレポーター遺伝子がコードする目印となる蛋白質の機能から容易に測定可能なものであれば、どのようなものでもかまわない。より好ましくは、当該目印となる蛋白質は、通常の哺乳類細胞中で安定的に存在し、同様の活性を示す内在的な蛋白質が当該細胞中に存在しないか、仮に存在しても容易に区別して測定可能なものであることが望ましい。また、より好ましくは、当該目印となる蛋白質をコードするmRNAは、細胞内で安定的に存在するものであることが望ましい。また、当該目印となる蛋白質の基質は、活性を測定するに際して、新たに添加する必要がないものであるか、あるいは添加を必要とするも、細胞内に容易に十分量取り込まれ得るものであることが望ましい。また、これらによって構成される測定系は、広範囲の直線性と高感度性を兼ね備えたものであることが望ましい。ホタル(firefly)由来のルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ(Renilla)由来のルシフェラーゼ遺伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、緑色蛍光蛋白質(GFP, Green Fluorescent Protein)遺伝子、増強型緑色蛍光蛋白質(EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein)遺伝子、 β -グルクロニダーゼ(β -Glucuronidase)遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(horse radish peroxidase, HRP)遺伝子などを用いることが可能である。より好ましくは、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を用いればよい。ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子については、改良型のルシフェラーゼ遺伝子(luc+)を用いることにより、測定系の検出感度を上げることができる。構造遺伝子下流の非翻訳領域については、例えばSV40ウイルスゲノム後期遺伝子由来の配列を用いることができる。

上述のGATA-1レポーター遺伝子は、それぞれクローニングベクターに連結し、大腸菌を宿主として増幅させる。その際のクローニングベクターとしては、大腸菌で増幅可能な複製開始点と選択マーカーをもったものであれば、特に限定されないが、例えばアンピシリン耐性マーカーと改良型のルシフェラーゼ構造遺伝子(luc+)をコードしたp

10

20

30

40

50

GL3-Basic (Promega Corporation)などを用いれば、上述のDNA構築物を容易に作製できる。その後、増幅したベクターを細胞に一過的に導入して、レポーター活性を測定すればよい。

また、本発明は、上述した方法を実施するために上記した必要なものの全て又は一部を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、あるいはGATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤等を選択するためのキットに関する。HDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為に測定用キットとしては、例えば、(i)HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6、HDAC7の各遺伝子を発現させて得られた酵素液、(ii)HDAC4及び/又はHDAC8の各遺伝子を発現させて得られた酵素液を含むものが挙げられる。さらに、上記キットは、他の構成物や使用説明書等を含んで構成することができる。

本発明は、上述した方法によって、又は上述したキットを用いることによって得られた血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、あるいはGATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤等の化合物を包含する。

さらに、上述した方法によって、又は上述したキットを用いることによって得られた化合物は、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤、および血小板減少作用の少ないHDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤として、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、繊維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、心臓、腎臓、肝臓、骨髄、皮膚、角膜、肺、膵臓、小腸、手足、筋肉、神経、椎間板、気管、筋芽細胞、軟骨等の臓器または組織の移植の際の拒絶反応、骨髄移植による移植片対宿主反応、自己免疫疾患、癌等の疾患の治療や予防に有用である。本発明は、このような化合物を有効成分として含む上記疾患の治療及び/又は予防用医薬、並びにこのような化合物の有効量を投与することを特徴とする上記疾患の治療及び/又は予防方法に関する。

上述した方法によって、又は上述したキットを用いることによって得られた化合物を医薬として用いる場合には、それ自体として医薬として用い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合わせた医薬製剤の形態、例えば固体、半固体または液体(例えば錠剤、丸剤、トローチ剤、カプセル剤、坐薬、クリーム剤、軟膏剤、エアロゾル剤、散剤、液剤、乳剤、懸濁剤など)で用いることができる。

患者への投与は、鼻、眼、外部(局所)、直腸、肺(鼻または口内注入)、経口または非経口(皮下、静脈および筋肉内を含む)投与または吸入に適している。注射剤の投与は、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なうことができる。投与量は、患者の体重、年齢及び病状、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、本発明は、正常なHDAC4酵素の機能を欠損する変異体(即ち、HDAC4ドミナントネガティブ(dominant negative)変異体)に関する。HDAC4ドミナントネガティブ変異体としては、例えば、配列番号4又は配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する(からなる)HDAC4変異体が挙げられる。さらに、本発明は、配列番号4又は配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常なHDAC4酵素の機能を欠損する変異体をも包含する。

さらに、本発明は、上述したHDAC4ドミナントネガティブ変異体をコードする塩基配列を有する(からなる)DNAに関する。より具体的には、本発明は、配列番号3又は配列番号5に記載の塩基配列を有する(からなる)DNAに関する。また、本発明は、配列番号4又は配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常なHDAC4酵素の機能を欠損する変異体をコードする塩基配列を有するDNAをも包含する。

また、本発明は、正常なHDAC1酵素の機能を欠損する変異体(即ち、HDAC1ド

10

20

30

40

50

ミナントネガティブ変異体)に関する。H D A C 1ドミナントネガティブ変異体としては、例えば、配列番号12又は配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する(からなる)H D A C 1変異体が挙げられる。さらに、本発明は、配列番号12又は配列番号14に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常なH D A C 1酵素の機能を欠損する変異体をも包含する。

さらに、本発明は、上述したH D A C 1ドミナントネガティブ変異体をコードする塩基配列を有する(からなる)D N Aに関する。より具体的には、本発明は、配列番号11又は配列番号13に記載の塩基配列を有する(からなる)D N Aに関する。また、本発明は、配列番号12又は配列番号14に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常なH D A C 1酵素の機能を欠損する変異体をコードする塩基配列を有するD N Aをも包含する。

また、本発明は、正常なH D A C 3酵素の機能を欠損する変異体(即ち、H D A C 3ドミナントネガティブ変異体)に関する。H D A C 3ドミナントネガティブ変異体としては、例えば、配列番号18又は配列番号20に記載のアミノ酸配列を有する(からなる)H D A C 3変異体が挙げられる。さらに、本発明は、配列番号18又は配列番号20に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常なH D A C 3酵素の機能を欠損する変異体をも包含する。

さらに、本発明は、上述したH D A C 3ドミナントネガティブ変異体をコードする塩基配列を有する(からなる)D N Aに関する。より具体的には、本発明は、配列番号17又は配列番号19に記載の塩基配列を有する(からなる)D N Aに関する。また、本発明は、配列番号18又は配列番号20に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常なH D A C 3酵素の機能を欠損する変異体をコードする塩基配列を有するD N Aをも包含する。

H D A C 1、H D A C 3、H D A C 4ドミナントネガティブ変異体やこれらの変異体を含む酵素液、及びこれらの変異体をコードするD N Aは、例えば、上述したスクリーニングにおいてネガティブコントロールとして使用することができる。また、本発明のスクリーニング方法を行なうためのキットにおいて、これらのH D A C 1、H D A C 3、H D A C 4ドミナントネガティブ変異体、これらの変異体を含む酵素液、又はこれらの変異体をコードするD N Aを含めることもできる。

【実施例】

以下に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例等に何ら制約されるものではない。

実施例1: I L - 2レポーター遺伝子アッセイ用のレポーター遺伝子プラスミドの構築

ヒトI L - 2遺伝子の転写開始点近傍の-674~+54の領域に相当する728塩基対断片を、ヒトT細胞由来のJ u r k a t細胞(ATCC, T I B - 152)より単離したG e n o m i c D N Aを鋳型(t e m p l a t e)にして、P C R法により取得した。P C Rには、下記の配列番号27及び配列番号28で示したプライマーを用いた。これらプライマーは遺伝子データベースG e n B a n kのL o c u s c o d e : H S I L 05に記載されたヒトI L - 2遺伝子配列を基に設計した。また、レポーター遺伝子アッセイ用ベクターに挿入するため、プライマーの末端に制限酵素認識部位を付加した。得られた728塩基対断片は、プロモーター上流側にN h e I認識部位、プロモーター下流側にH i n d I I I認識部位を有している。増幅した728塩基対断片をクローニングベクターp C R 4 (I n v i t o r g e n社製)に挿入した。次いで、得られたプラスミドにおける挿入領域の塩基配列(配列番号23)を確認した。その結果、挿入領域の塩基配列(配列番号23)では、G e n B a n kのL o c u s c o d e : H S I L 05に記載されたI L - 2のプロモーター配列(配列番号29)と比較して、図1に示したように3ヶ所の塩基置換、1ヶ所の2塩基挿入及び1ヶ所の1塩基挿入が確認された。次に、得られたプラスミドをN h e I認識部位及びH i n d I I I認識部位で切断した。得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーター遺伝子アッセイ用ベクターp G L 3 b a s i c (P r o m e g a社製)のN h e I / H i n d I I I部位に挿入し

た。これにより、ヒト I L - 2 遺伝子の転写開始点近傍の - 6 7 5 ~ + 5 6 の領域に相当する 7 3 1 塩基対の配列 (配列番号 2 3) をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミド p G L 3 I L 2 P r o を得た。

TCGCTAGCCTGAGTATTTAACAATCGCACCT (配列番号 2 7)

CGAAGCTTGTGGCAGGAGTTGAGGTTACTG (配列番号 2 8)

次に、p G L 3 I L 2 P r o を鋳型にして、ヒト I L - 2 遺伝子の転写開始点近傍の - 3 7 9 ~ + 5 6 の領域に相当する 4 3 5 塩基対断片を、P C R 法により取得した。P C R には、下記の配列番号 3 0 及び上記の配列番号 2 8 で示したプライマーを用いた。配列番号 3 0 のプライマーは p G L 3 I L 2 P r o に挿入されているヒト I L - 2 遺伝子配列を基に設計した。また、レポーター遺伝子アッセイ用ベクターに挿入するため、プライマーの末端に制限酵素認識部位を付加した。得られた 4 3 5 塩基対断片は、プロモーター上流側に N h e I 認識部位、プロモーター下流側に H i n d I I I 認識部位を有している。増幅した 4 3 5 塩基対断片をクローニングベクター p C R 4 に挿入した。次いで、得られたプラスミドにおける挿入領域の塩基配列 (配列番号 2 4) を確認した。その結果、挿入領域の塩基配列 (配列番号 2 4) では、G e n B a n k の L o c u s c o d e : H S I L 0 5 に記載された I L - 2 のプロモーター配列 (配列番号 3 1) と比較して、図 2 示したように 2 ケ所の塩基置換と 1 ケ所の 2 塩基の挿入が確認された。次に、得られたプラスミドを N h e I 認識部位及び H i n d I I I 認識部位で切断した。得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーター遺伝子アッセイ用ベクター p G L 3 b a s i c の N h e I / H i n d I I I 部位に挿入した。これにより、ヒト I L - 2 遺伝子の転写開始点近傍の - 3 7 9 ~ + 5 6 の領域に相当する 4 3 5 塩基対のプロモーター配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミド p G L 3 I L 2 P r o 4 3 を得た。

CGCTAGCTGCTCTTGTCCACCACAATATGC (配列番号 3 0)

実施例 2 : G A T A - 1 レポーター遺伝子アッセイ用のレポーター遺伝子プラスミドの構築

ヒト G A T A - 1 遺伝子転写開始点近傍の - 7 8 9 ~ + 3 2 の領域に相当する 8 2 1 塩基対断片を、ヒト G e n o m i c D N A を鋳型にして、P C R 法により取得した。P C R には、下記の配列番号 3 2 及び配列番号 3 3 で示されるプライマーを用いた。これらプライマーは遺伝子データベース G e n B a n k の A c c e s s i o n 番号 A F 1 9 6 9 7 1 に記載されたヒト G A T A - 1 遺伝子配列を基に設計した。また、レポーター遺伝子アッセイ用ベクターに挿入するため、プライマーの末端に制限酵素認識部位を付加した。得られた 8 2 1 塩基対断片は、プロモーター上流側に B g l I I 認識部位、プロモーター下流側に H i n d I I I 認識部位を有している。増幅した 8 2 1 塩基対断片をクローニングベクター p C R 4 に挿入した。次いで、得られたプラスミドにおける挿入領域の塩基配列 (配列番号 2 5) を確認した。その結果、挿入領域の塩基配列 (配列番号 2 5) は、G e n B a n k の A c c e s s i o n 番号 A F 1 9 6 9 7 1 に記載された G A T A - 1 のプロモーター配列と一致していた (図 3)。次に、得られたプラスミドを N h e I 認識部位及び H i n d I I I 認識部位で切断した。得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーター遺伝子アッセイ用ベクター p G L 3 b a s i c の N h e I / H i n d I I I 部位に挿入した。これにより、G A T A - 1 遺伝子のプロモーター領域 - 7 8 9 ~ + 3 2 の領域に相当する 8 2 1 塩基対の配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミド p G L 3 - I E を得た。

ATAGATCTATCCCTGGCTCCCACCTCAG (配列番号 3 2)

ATAAGCTTTGGTGGTTGCGGAGGGTTTCG (配列番号 3 3)

次に、ヒト G A T A - 1 遺伝子転写開始点上流 - 3 7 6 9 ~ - 3 1 3 3 の領域に相当する 6 3 7 塩基対断片を、ヒト G e n o m i c D N A を鋳型にして、P C R 法により取得した。P C R には、下記の配列番号 3 4 及び配列番号 3 5 で示したプライマーを用いた。

10

20

30

40

50

これらプライマーは遺伝子データベース GenBank の Accession 番号 AF196971 に記載されたヒト GATA-1 遺伝子配列を基に設計した。また、レポーター遺伝子アッセイ用ベクターに挿入するため、プライマーの末端に制限酵素認識部位を付加した。得られた 637 塩基対断片は、プロモーター上流側に Kpn I 認識部位、プロモーター下流側に Nhe I 認識部位を有している。増幅した 637 塩基対断片をクローニングベクター pCR4 に挿入した。次いで、得られたプラスミドにおける挿入領域の塩基配列（配列番号 26）を確認した。その結果、挿入領域の塩基配列（配列番号 26）は、GenBank の Accession 番号 AF196971 に記載された GATA-1 のプロモーター配列と一致していた（図 4）。さらに、得られたプラスミドを Kpn I 認識部位及び Nhe I 認識部位で切断した。得られた断片を、pGL3-IE プロモーターの Kpn I / Nhe I 部位に挿入した。これにより、GATA-1 遺伝子の転写開始点上流 -3769 ~ -3133 の領域に相当する 637 塩基対、及び -789 ~ +32 の領域に相当する 821 塩基対の配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミド pGL3-HSI-IE Pro を得た。

10

ATGGTACCACCCCAGAAGATGCCAGGAG（配列番号 34）

ATGCTAGCGCCCTCTGAGCCTCAGTTTC（配列番号 35）

実施例 3：

3.1. HDAC1~8 サブクローニング用プラスミドの構築

表 1 に示される鑄型とプライマーを用いて PCR により各種 HDAC アイソザイム全長を増幅し、一旦 pGEM-T (Promega) にサブクローニングした。その後、HDAC1~6 全長を制限酵素 (HDAC1: EcoRI/NotI, HDAC2: BamHI/NotI, HDAC3: EcoRI/NotI, HDAC4: EcoRI/NotI, HDAC5: HindIII/NotI, HDAC6: HindIII/NotI) 処理によって pBluescriptII KS (+) (TOYOBO) へ挿入した。HDAC7, 8 全長は pUC18 (Takara) (SmaI 処理) にサブクローニングした。詳細については、表 1 を参照のこと。

20

表1 HDAC1~8サブクローニング用プラスミドの作製

HDAC アイソザイム	HDAC 全長増幅用の鋳型	HDAC 全長増幅用のプライマー対の配列	GenBank 登録番号 ^{注1)}	PCR 産物のサイズ ^{注2)}	作製したプラスミドの名称 ^{注3)}
HDAC1	Jurkat T-cell cDNA library (Clontech)	HDAC1-E: GAGGAATCAAGATGGCGCAGAC (配列番号36) HDAC1-N: GGAGCGCCGCTTCAGGCCAACCTTG (配列番号37)	D50405	約 1.5kbp	pMH107
HDAC2	Human brain cDNA library (Clontech)	HDAC2-B: GGGGATCCATGGGTACACTCAAG (配列番号38) HDAC2-N: GGTGGCGCCCAAAATTCAGGGGTGCTG (配列番号39)	HSU31814	約 1.5kbp	pMH111
HDAC3	Human placenta cDNA library (Clontech)	HDAC3-E: CCGGATCCACCATGGCCAAAGC (配列番号40) HDAC3-N: GCAGCGCCGCCACTCTTAATCTCCAC (配列番号41)	U66914	約 1.2kbp	pMH108
HDAC4	Human brain cDNA library (Clontech)	HDAC4-E: GGGAAATTCATGAGCTCCCAAAGCCATCC (配列番号42) HDAC4-N: AAGGGCGCCGAGCTCGAGGGAGTCTAC (配列番号43)	AF132607	約 3.2kbp	pMH106
HDAC5	Human brain cDNA library (Stratagene)	HDAC5-H: GCGAAGCTTATGAACTCTCCCAACCAG (配列番号44) HDAC5-N: GGGCGCGCCCTCACAGGCAGGCTCTCTG (配列番号45)	AF132608	約 3.3kbp	pMH109
HDAC6	Human brain cDNA library (Stratagene)	HDAC6-H: GCGAAGCTTATGAACTCAACCGGCCAG (配列番号46) HDAC6-N: GCATGGCGCCGTTAGTGTGGTGGGGCATATC (配列番号47)	AF132609	約 3.6kbp	pMH110
HDAC7	Human kidney cDNA library (Clontech)	HDAC7/forward: CGAATTCAGCCCGCAGCCCATGGACCT (配列番号48) HDAC7/reverse: CCGTACCCCTGTGCACCCCGGATCACGG (配列番号49)	AF29243	約 2.6kbp	pUC18-HDAC7
HDAC8	Human lung cDNA library (Clontech)	HDAC8/forward: CGAATTCCTTAAGCGGAAGATGGAGG (配列番号50) HDAC8/reverse: ACGTACCGAACCACATGCTTCAGATTC (配列番号51)	HSA27724	約 1.1kbp	pUC18-HDAC8

注1) プライマー設計時に参考にした各種HDACのGenBank登録番号

注2) 各種HDAC全長のサイズ

注3) 各HDACについて作製されたプラスミドの名称。サブクローニング用プラスミドは、HDAC1~6についてはpBluescriptII KS(+), HDAC7及び8についてはpUC18を用いた。

3.2. HDAC1~8発現用プラスミドの構築

次に、HDAC1~8のC末端にFlag配列を付加した発現用プラスミドを作製した。詳細は、以下の通りである。

HDAC3

pMH108を鋳型として、下記のプライマー108E(配列番号52)及び108KFN(配列番号53)を用いてPCRによりHDAC3全長を増幅した。尚、プライマー

は、C末端にFlag配列(DYKDDDDK)(配列番号54)を付加するように設計した。得られたPCR断片をpGEM-T(Promega)にサブクローニングし、pGEM-HDAC3-Flag(E108KFN)を得た。E108KFNをEcoRI/NotI(約1.2kbp断片)処理によってpEAK10(Edge Biosystems)に挿入し、pEAK-HDAC3(pMH118)を得た。

108E: CTGAATTCACCATGGCCAAGACCG (配列番号52)

108KFN: GGGCGGCCGCTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAAATCGGTACCAATCTCCACATCG

CTTTC (配列番号53)

10

HDAC1

pMH107を鋳型として、プライマーHDAC1-E(配列番号36)及び107K(配列番号55)を用いてPCRによりHDAC1全長を増幅した。尚、プライマーは、C末端の停止コドンを改変し、KpnI部位を挿入するように設計した。得られたPCR断片をpGEM-T(Promega)にサブクローニングし、pGEM-HDAC1(E107K)を得た。E107KをEcoRI/KpnI(約1.5kbp断片)処理によってpMH118(EcoRI/KpnI)約6kbpに挿入し、pEAK-HDAC1(pMH119)を得た。

107K: ATCGGTACCGGCCAACTTGACCTCCTCCTTG (配列番号55)

HDAC2

pMH111を鋳型として、プライマーHDAC2-B(配列番号38)及び111K(配列番号56)を用いてPCRによりHDAC2全長を増幅した。尚、プライマーは、C末端の停止コドンを改変し、KpnI部位を挿入するように設計した。得られたPCR断片をpGEM-T(Promega)にサブクローニングし、pGEM-HDAC2を得た。pGEM-HDAC2をBamHI/KpnI処理によってpFLAG-CMV-5a(SIGMA)(BamHI/KpnI)に挿入し、pFLAG-CMV-5a-HDAC2(pMH113)を得た。pMH113をEcoRI/KpnI(約1.5kbp断片)処理によってpMH118(EcoRI/KpnI)約6kbpに挿入し、pEAK-HDAC2(pMH121)を得た。

111K: ATCGGTACCGGGTTGCTGAGCTGTTCTG (配列番号56)

20

30

HDAC4

pMH106を鋳型として、プライマーHDAC4-E(配列番号42)及び106B(配列番号57)を用いてPCRによりHDAC4全長を増幅した。尚、プライマーは、C末端の停止コドンを改変し、BglII部位を挿入するように設計した。得られたPCR断片をpGEM-T(Promega)にサブクローニングし、pGEM-HDAC4(E106B)を得た。また、pBluescriptIIKS(+)のEcoRI/NotI処理断片約3kbpにBglII siteおよびFLAG配列(DYKDDDDK)を有するリンカーオリゴ(FLAG-E(配列番号58)、FLAG-N(配列番号59)をアニーリングさせたもの)を挿入し、pBlue-Flagを得た。E106BをEcoRI/BglII処理によりpBlue-Flagに挿入し、pBKS-HDAC4(E106BN)を得た。E106BNをEcoRI/NotI(約3.2kbp断片)処理によってpEAK10(Edge Biosystems)(EcoRI/NotI)約6kbpに挿入し、pEAK-HDAC4(pMH122)を得た。

40

106B: GATAGATCTCAGGGGCGGCTCCTCTTC (配列番号 57)

FLAG-E: AATTCCTGCAGAGATCTGATTACAAGGACGACGATGACAAGTAGGC (配列番号
58)

FLAG-N: GGCCGCCTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAATCAGATCTCTGCAGG (配列番号
59)

HDAC5

p3XFLAG-CMV-10(SIGMA)(HindIII/NotI)約6.3 kbpにpMH109 HindIII/NotI断片約3.3kbpを挿入し、p3XFLAG-CMV-10-HDAC5(pMH144)を得た。 10

HDAC6

p3XFLAG-CMV-10(SIGMA)(HindIII/NotI)約6.3 kbpにpMH110 HindIII/NotI断片約3.6kbpを挿入し、p3XFLAG-CMV-10-HDAC6(pMH145)を得た。

HDAC7

PMH118(EcoRI/KpnI)約6kbpにpUC18-HDAC7 EcoRI/KpnI断片約2.6kbpを挿入し、pEAK-HDAC7(pMH141)を得た。 20

HDAC8

PMH118(EcoRI/KpnI)約6kbpにpUC18-HDAC8 EcoRI/KpnI断片約1.1kbpを挿入し、pEAK-HDAC8(pMH140)を得た。

作製した各HDAC発現用ベクターの詳細については、表2を参照のこと。

表2 HDAC1~8 発現用プラスミドの作製

HDAC	用いられた発現用プラスミド ^{注1)}	各 HDAC に対する Flag タグ (DYKDDDK) の位置	作製したプラスミドの名称
HDAC1	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH119
HDAC2	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH121
HDAC3	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH118
HDAC4	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH122
HDAC5	p3XFLAG-CMV-10 (SIGMA)	N 末端	pMH144
HDAC6	p3XFLAG-CMV-10 (SIGMA)	N 末端	pMH145
HDAC7	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH141
HDAC8	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH140

注1) pEAK10 (Edge Bio Systems)は、EF1 α (伸長因子1 α) プロモーターにより制御される。p3XFLAG-CMV-10(SIGMA)は、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーターにより制御される。

また、HDAC1, 2, 3, 4, 7, 8は、EcoRI/NotIにて、HDAC5, 6は、HindIII/NotIにて各発現用プラスミドに挿入されている。

10

20

30

実施例4 : IL-2 転写活性に対するHDAC各種アイソザイム過剰発現の効果

ヒトIL-2プロモーター配列(転写開始点近傍の-674~+54の領域)をホタルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミドpGL3 IL2 Pro43 1 μ gとpRL-TK(Promega)6 μ gおよび各種HDACアイソザイム発現用またはmockプラスミド(mockプラスミドはpEAK10であり、各種HDAC発現用プラスミドは、それぞれ、HDAC1:pMH119, HDAC2:pMH121, HDAC3:pMH118, HDAC4:pMH122, HDAC5:pMH144, HDAC6:pMH145, HDAC7:pMH141, HDAC8:pMH140である)10 μ gを混和し、エレクトロポレーション法(BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧300V、電荷975 μ F、400 μ L)により、1x10⁷ cellsのJurkat細胞(ATCC, TIB-152)を形質転換した。

40

形質転換後、2.5mLの10% FBS(MOREGATE)を含むRPMI 1640(SIGMA)(10% FBS RPMI 1640)を加え、50 μ L/wellの割合で、96well white plateに分注した。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で10時間培養後、10% FBS RPMI 1640液を50 μ L/wellずつ添加し、さらにPhorbol 12-Myristate 13-Acetate(PMA, SIGMA)、Ionomycin(SIGMA)、Anti CD28 antibody(Pharmingen)を10% FBS RPMI 1640で混合した液を50 μ L/wellずつ加え(終濃度それぞれ50ng/mL、1 μ

50

g / mL、75 ng / mL)、Jurkat細胞を刺激した。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で12時間培養後、Dual Luciferase Assay System (Promega)のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンター(1420 MULTILABEL COUNTER ARVO SX, WALLAC)により測定した。

その結果、PMA、Ionomycin、Anti CD28 antibodyによるJurkat細胞への刺激に应答して、pGL3 IL2 Pro43からルシフェラーゼが誘導され、その発現量がHDAC4, 8の過剰発現により増加することがわかった(図5)。また、各種HDACアイソザイムの過剰発現が、細胞増殖度に大きな影響を及ぼさないことをCell Counting Kit-8 (DOJIN)を用いて確認した(図5)。

10

以上の結果から、HDAC4, 8がIL-2転写系に関与するHDACアイソザイムであることがわかった。

実施例5: GATA-1転写活性に対するHDAC各種アイソザイム過剰発現の効果

ヒトGATA-1プロモーター配列(転写開始点近傍の-3769~-3133および-789~+32の領域)をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミドpGL3-HSI-IE Pro 5μgおよび各種HDACアイソザイム発現用またはmockプラスミド(mockはpEAK10、HDAC1~4, 7, 8はEF-1プロモーター支配下、HDAC5, 6はCMVプロモーター支配下、各種HDACアイソザイムはC末端またはN末端にFlagタグを有する)10μgを混和し、エレクトロポレーション法(BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧1750V、電荷10μF、365μL)により、8.75x10⁶ cellsのHEL細胞(受託番号JCRB0062、JCRB)を形質転換した。形質転換後、2mLの10% FBS RPMI 1640を加え、50μL/wellの割合で、96well white plateに分注した。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で3時間培養後、10% FBS RPMI 1640培地を100μL/wellずつ加えた。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で8時間培養後、Dual Luciferase Assay Systemのマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンターにより測定した。

20

その結果、pGL3-HSI-IE ProからGATA-1のプロモーターに依存したルシフェラーゼが誘導され、更に、誘導されるルシフェラーゼの発現量は、HDAC1, 3, 7の過剰発現により若干上昇することがわかった(図6)。

30

以上より、GATA-1転写系にはHDAC1, 3, 7が関与しており、IL-2転写系に関与するHDAC4, 8はGATA-1転写系には大きく関与しないことがわかった。

実施例6: HDAC4ドミナントネガティブ変異体の作製

IL-2転写への関与が大きいと思われるHDAC4について、内在性HDAC4の機能を失わせる目的でHDAC4ドミナントネガティブ(dominant negative)変異体を作製することとした。そこで、PNAS, 1998, Vol. 95, p. 3519-3524 & Mol. Cell. Biol., 1999, Vol. 19(1), p. 7816-7827の文献情報よりHDAC活性を低下させるための変異導入部位を決定した(H802K H803L、H863L)(図7)。ヒトHDAC4 CDS塩基配列をGenBankのaccession番号AF132607より入手し、変異導入のためのプライマーを設計した(各プライマーの塩基配列については表3を参照、HDAC4 CDS塩基配列については配列番号1、HDAC4 CDS塩基配列がコードするアミノ酸配列については配列番号2を参照)。

40

表3 HDAC4 ドミナントネガティブ変異体の作製 (PCR 反応時の鑄型およびプライマー)

HDAC4 ドミナントネガティブ変異体	鑄型	プライマー対の配列	PCR産物のサイズ
(H802K, H803L)	(1) E106BN (2) E106BN	(1) NdeIFW: CAGTGACACCATATGGAACGAGG (配列番号60) HDAC4-mutation-2RV: GCAAGCTTTCAGGGGGGG (配列番号61) (2) HDAC4-mutation-2FW: CCCCCTGGAAGCTTGGGGA (配列番号62) BsrGIRV: GACATGTACAGGACCGCTAGGGT (配列番号63)	(1) 約140bp (2) 約180bp
(H863L)	(3) (1)、(2)のPCR断片 E106BN	(3) NdeIFW: CAGTGACACCATATGGAACGAGG (配列番号60) BsrGIRV: GACATGTACAGGACCGCTAGGGT (配列番号63) mutation3FW: CCTGTACATGTCCCTCCTTCG (配列番号64) 3' XbaBglRV: ATAGATCTAGACAGGGGGGG (配列番号65)	(3) 約300bp 約700bp

10

20

30

40

Expand (High fidelity PCR System (Roche)) のプロトコールに従ってPCR反応を行った。鑄型に用いたE106BNはpBluescript II KS (+) (TOYOBO) にHDAC4 CDS全長が挿入 (EcoRI/NotI, EcoRI側が開始コドン) されたプラスミドである。

Topo TA cloning kit for sequence (Invitrogen社) を用い、得られたPCR産物 (H802K, H803L変異体に関しては(3)) をそれぞれTOPO cloning vector for sequence

50

にサブクローニングした (pCR4 - HDAC4 (H802K, H803L) および pCR4 - HDAC4 (H863L))。次いで、シーケンシングにより変異導入を確認した PCR断片を、以下の手順でHDAC4発現用プラスミド (pMH122) に挿入した。
HDAC4ドミナントネガティブ変異体 (H802K, H803L)

E106BN (NdeI / BsrGI) 約3kbpにpCR4 - HDAC4 (H802K, H803L) NdeI / BsrGI 処理断片約300bpを挿入し、pBKS - HDAC4 (H802K, H803L) を得た。続いて、pMH122 (EcoRI / NotI) 約6kbpにpBKS - HDAC4 (H802K, H803L) EcoRI / NotI 処理断片約3.3kbpを挿入し、pEAK - HDAC4 (H802K, H803L) を得た。HDAC4ドミナントネガティブ変異体 (H802K, H803L) のコード領域における塩基配列を配列番号3として、そのアミノ酸配列を配列番号4として示す。

10

HDAC4ドミナントネガティブ変異体 (H863L)

E106BN (BsrGI / BglII) 約3kbpにpCR4 - HDAC4 (H863L) BsrGI / BglII 処理断片約750bpを挿入し、pBKS - HDAC4 (H863L) を得た。続いて、pMH122 (EcoRI / NotI) 約6kbpにpBKS - HDAC4 (H863L) EcoRI / NotI 処理断片約3.3kbpを挿入し、pEAK - HDAC4 (H863L) を得た。HDAC4ドミナントネガティブ変異体 (H863L) のコード領域における塩基配列を配列番号5として、そのアミノ酸配列を配列番号6として示す。

実施例7：HDAC1ドミナントネガティブ変異体の作製

20

HDAC4ドミナントネガティブ変異体の作製と同様に、HDAC1ドミナントネガティブ変異体を作製した。ヒトHDAC1 CDS塩基配列をGenBankのaccession番号D50405より入手し、変異導入のためのプライマーを設計した (各プライマーの塩基配列については表4を参照、HDAC1 CDS塩基配列については配列番号9、HDAC1 CDS塩基配列がコードするアミノ酸配列については配列番号10を参照)。

表4 HDAC1 ドミナントネガティブ変異体の作製 (PCR 反応時の鑄型およびプライマー)

HDAC1 ドミナントネガティブ変異体	鑄型	プライマー対の配列	PCR産物のサイズ
(H140K, H141L)	(1) pEAK-HDAC1	(1) HDAC1-E: GAGGAATCAAGATGGCCAGAC (配列番号66) 1-140KL-RV: CTCGGACTTCTTTGCAAGCTCAGG (配列番号67)	(1) 約440bp
	(2) pEAK-HDAC1	(2) 1-140KL-FW: GGGCCTGAAGCTTGCAAAAGAAATC (配列番号68) 1-BsrGI-RV: GTGAATATCAATGTCAATGTACAGC (配列番号69)	(2) 約120bp
	(3) (1)、(2)のPCR断片	(3) HDAC1-E: GAGGAATCAAGATGGCCAGAC (配列番号66) 1-BsrGI-RV: GTGAATATCAATGTCAATGTACAGC (配列番号69)	(3) 約530bp
(H199L)	(1) pEAK-HDAC1	(1) 1-StuI-FW: GACGGGTGGAAGAGCCCTTC (配列番号70) 1-199L-RV: GAAGTACTCTCCATATACTTAAGAAAGG (配列番号71)	(1) 約80bp
	(2) pEAK-HDAC1	(2) 1-199L-FW: CTGTGTCTTTTCTTAAGTATGGAGAG (配列番号72) 1-HpaI-RV: TCTCGGAGCGGGTAGTTAACAG (配列番号73)	(2) 約100bp
	(3) (1)、(2)のPCR断片	(3) 1-StuI-FW: GACGGGTGGAAGAGCCCTTC (配列番号70) 1-HpaI-RV: TCTCGGAGCGGGTAGTTAACAG (配列番号73)	(3) 約150bp

10

20

30

40

Expand (High fidelity PCR System (Roche)) のプロトコルに従ってPCR反応を行った。鑄型に用いたpEAK-HDAC1 (pMH119) はpEAK10にHDAC1 CDS全長が挿入されたプラスミドである。

Topo TA cloning kit for sequence (Invitrogen社)を用い、得られたPCR product (3)をそれぞれTOPO cloning vector for sequenceにサブクローニングした (pCR4-HDAC1 (H140K, H141L) および pCR4-HDAC1 (H199L))。シーケンシングにより変異導入を確認したPCR断片を、以下の手順でHDAC1発

50

現用プラスミド (pMH119) に挿入した。E107KはpGEM-T (Promega) にHDAC1 CDS全長が挿入 (EcoRI/KpnI, EcoRI側が開始コドン) されたプラスミドである。

HDAC1ドミナントネガティブ変異体 (H140K, H141L)

E107K (EcoRI/BsrGI) (約3kbp) にpCR4-HDAC1 (H140K, H141L) のEcoRI/BsrGI処理断片 (約530bp) を挿入し、pGEM-HDAC1 (H140K, H141L) を得た。続いて、pGEM-HDAC1 (H140K, H141L) (EcoRI/KpnI) 約1.5kbpをpMH119のEcoRI/KpnI処理断片 (約5.9kbp) に挿入し、pEAK-HDAC1 (H140K, H141L) を得た。HDAC1ドミナントネガティブ変異体 (H140K, H141L) のコード領域における塩基配列を配列番号11として、そのアミノ酸配列を配列番号12として示す。

10

HDAC1ドミナントネガティブ変異体 (H199L)

E107K (StuI/HpaI) (約3kbp) にpCR4-HDAC1 (H199L) のStuI/HpaI処理断片 (約150bp) を挿入し、pGEM-HDAC1 (H199L) を得た。続いて、pGEM-HDAC1 (H199L) (EcoRI/KpnI) 約1.5kbpをpMH119のEcoRI/KpnI処理断片 (約5.9kbp) に挿入し、pEAK-HDAC1 (H199L) を得た。HDAC1ドミナントネガティブ変異体 (H199L) のコード領域における塩基配列を配列番号13として、そのアミノ酸配列を配列番号14として示す。

20

実施例8: HDAC3ドミナントネガティブ変異体の作製

HDAC4ドミナントネガティブ変異体の作製と同様に、HDAC3ドミナントネガティブ変異体を作製した。ヒトHDAC3 CDS塩基配列をGenBankのaccession番号U66914より入手し、変異導入のためのプライマーを設計した (各プライマーの塩基配列については表5を参照、HDAC3 CDS塩基配列については配列番号15、HDAC3 CDS塩基配列がコードするアミノ酸配列については配列番号16を参照)。

表5 HDAC3 ドミナントネガティブ変異体の作製 (PCR 反応時の鑄型およびプライマー)

HDAC3 ドミナントネガティブ変異体 (H134K, H135L)	鑄型	プライマー対の配列	PCR 産物のサイズ
(H134K, H135L)	(1) pEAK-HDAC3	(1) 3-BglII-FW: AACCCAGCTGAACAACAAGATCTG (配列番号 74) 3-134KL-RV: CTCAAAACCTTCTTGGCAAGCITTCAGAC (配列番号 75)	(1) 約 75bp
	(2) pEAK-HDAC3	(2) 3-134KL-FW: TGCTGGTCTGAAGCTTCCCAAGAAG (配列番号 76) 3-NeoI-RV: CCCGTCACCATGGTGGATGTC (配列番号 77)	(2) 約 140bp
	(3) (1)、(2)の PCR 断片	(3) 3-BglII-FW: AACCCAGCTGAACAACAAGATCTG (配列番号 74) 3-NeoI-RV: CCCGTCACCATGGTGGATGTC (配列番号 77)	(3) 約 180bp
(H193L)	(1) pEAK-HDAC3	(1) 3-NeoI-FW: TGACATTGACATCCACCATGGTG (配列番号 78) 3-193L-RV: GAAGTAATTTCCGTTACTTAAGGAAGG (配列番号 79)	(1) 約 100bp
	(2) pEAK-HDAC3	(2) 3-193L-FW: TGTCCTTCCTTAAGTACGGAATTAC (配列番号 80) 3-PmaCI-RV: GAGCACAAATGCACGTGGTTGG (配列番号 81)	(2) 約 190bp
	(3) (1)、(2)の PCR 断片	(3) 3-NeoI-FW: TGACATTGACATCCACCATGGTG (配列番号 78) 3-PmaCI-RV: GAGCACAAATGCACGTGGTTGG (配列番号 81)	(3) 約 260bp

Expand (High fidelity PCR System (Roche)) のプロトコールに従って PCR 反応を行った。鑄型に用いた pEAK-HDAC3 (pMH118) は pEAK10 に HDAC3 CDS 全長が挿入されたプラスミドである。

Topo TA cloning kit for sequence (Invitrogen 社) を用い、得られた PCR product (3) をそれぞれ TOPO cloning vector for sequence にサブクローニングした (pCR4-HDAC3 (H134K, H135L) および pCR4-HDAC3 (H193L))。シーケンシングにより変異導入を確認した PCR 断片を、以下の手順で HDAC3 発現用プラスミド (pMH118) に挿入した。

10

20

30

40

50

H D A C 3 ドミナントネガティブ変異体 (H 1 3 4 K , H 1 3 5 L)

p B l u e s c r i p t I I K S (-) (T O Y O B O) (E c o R I / K p n I) (約 3 k b p) に p M H 1 1 8 の E c o R I / K p n I 処理断片 (約 1 . 3 k b p) を挿入し、p B K S - H D A C 3 を得た。続いて、p B K S - H D A C 3 (B g l I I / N c o I) (約 3 k b p) に p C R 4 - H D A C 3 (H 1 3 4 K , H 1 3 5 L) (B g l I I / N c o I) 約 1 8 0 b p を挿入し、p B K S - H D A C 3 (H 1 3 4 K , H 1 3 5 L) を得た。最後に、p B K S - H D A C 3 (H 1 3 4 K , H 1 3 5 L) (E c o R I / K p n I) 約 1 . 3 k b p を p M H 1 1 8 の E c o R I / K p n I 処理断片 (約 5 . 7 k b p) に挿入し、p E A K - H D A C 3 (H 1 3 4 K , H 1 3 5 L) を得た。H D A C 3 ドミナントネガティブ変異体 (H 1 3 4 K , H 1 3 5 L) のコード領域における塩基配列を配列番号 1 7 として、そのアミノ酸配列を配列番号 1 8 として示す。 10

H D A C 3 ドミナントネガティブ変異体 (H 1 9 3 L)

p M H 1 1 8 (N c o I / P m a C I) 約 7 k b p に p C R 4 - H D A C 3 (H 1 3 4 K , H 1 3 5 L) (N c o I / P m a C I) 約 2 6 0 b p を挿入し、p E A K - H D A C 3 (H 1 9 3 L) を得た。H D A C 3 ドミナントネガティブ変異体 (H 1 9 3 L) のコード領域における塩基配列を配列番号 1 9 として、そのアミノ酸配列を配列番号 2 0 として示す。

実施例 9 : H D A C 4 ドミナントネガティブ変異体発現による I L - 2 転写活性抑制

ヒト I L - 2 プロモーター配列 (転写開始点近傍の - 6 7 4 ~ + 5 4 の領域) をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミド p G L 3 I L 2 P r o 4 3 1 μ g と p R L - T K (P r o m e g a) 6 μ g に、野生型 H D A C 4 または実施例 3 にて作製した H D A C 4 ドミナントネガティブ変異体 (H 8 0 2 K H 8 0 3 L , H 8 6 3 L) 発現用プラスミドを量比を変えて (1 , 3 , 1 0 μ g) 混和し、エレクトロポレーション法 (B I O - R A D , G e n e P u l s e r I I , 電圧 3 0 0 V 、電荷 9 7 5 μ F 、4 0 0 μ L) により、 1×10^7 cells の J u r k a t 細胞 (A T C C , T I B - 1 5 2) を形質転換した。 20

形質転換後、2 . 5 m L の 1 0 % F B S (M O R E G A T E) を含む R P M I 1 6 4 0 (1 0 % F B S R P M I 1 6 4 0) を加え、5 0 μ L / w e l l の割合で、9 6 w e l l w h i t e p l a t e に分注した。3 7 ° C 、5 % C O ₂ 、飽和湿度条件下で 1 0 時間培養後、P h o r b o l 1 2 - M y r i s t a t e 1 3 - A c e t a t e (P M A , S I G M A) 、I o n o m y c i n (S I G M A) 、A n t i C D 2 8 a n t i b o d y (P h a r m i n g e n) を 1 0 % F B S R P M I 1 6 4 0 で混合した液を 5 0 μ L / w e l l ずつ加え (終濃度それぞれ 5 0 n g / m L 、1 μ g / m L 、7 5 n g / m L) 、J u r k a t 細胞を刺激した。3 7 ° C 、5 % C O ₂ 、飽和湿度条件下で 1 2 時間培養後、B r i g h t - G l o L u c i f e r a s e A s s a y S y s t e m (P r o m e g a) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンター (1 4 2 0 M U L T I L A B E L C O U N T E R A R V O S X , W A L L A C) により測定した。 30

その結果、H D A C 4 ドミナントネガティブ変異体 (H 8 0 2 K H 8 0 3 L , H 8 6 3 L) の発現量依存的な I L - 2 転写抑制が認められた (図 8) 。導入した H D A C の発現量は抗 F l a g 抗体 (S I G M A , a n t i F l a g M 2) を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。 40

以上より、H D A C 4 の機能を選択的に抑制することによって、I L - 2 の転写が抑制されることが示唆された。

実施例 1 0 : H D A C 4 ドミナントネガティブ変異体発現による細胞増殖抑制

野生型 H D A C 4 および実施例 6 にて作製した H D A C 4 ドミナントネガティブ変異体 (H 8 6 3 L) 発現用プラスミド 1 0 μ g を J u r k a t , H E L , 2 9 3 細胞にトランスフェクションした。

J u r k a t 細胞 (A T C C , T I B - 1 5 2) はエレクトロポレーション法 (B I O - R A D , G e n e P u l s e r I I , 電圧 3 0 0 V 、電荷 9 7 5 μ F 、4 0 0 μ L 50

)により、 1×10^7 cellsの細胞を形質転換した。形質転換後、2.5 mLの10% FBS (MOREGATE)を含むRPMI 1640 (10% FBS RPMI 1640)を加え、50 μ L/wellの割合で、96 well white plateに分注した。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で5時間培養後、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, SIGMA)、Ionomycin (SIGMA)、Anti CD28 antibody (Pharmin gen)を10% FBS RPMI 1640で混合した液を50 μ L/wellずつ加え(終濃度それぞれ50 ng/mL、1 μ g/mL、75 ng/mL)、Jurkat細胞を刺激した。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で4時間培養後にCell Counting Kit-8 (DOJIN)を用いて確認した。

10

HEL細胞(受託番号JCRB0062、JCRB)はエレクトロポレーション法(BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧1750V、電荷10 μ F、365 μ L)により、 8.75×10^6 cellsの細胞を形質転換した。形質転換後、2 mLの10% FBS RPMI 1640を加え、50 μ L/wellの割合で、96 well white plateに分注した。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で10時間培養後、10% FBS RPMI 1640培地を50 μ L/wellずつ加え、さらに12時間培養後にCell Counting Kit-8 (DOJIN)を用いて確認した。

293細胞(ATCC, CRL-1573)は、リン酸カルシウム法にてトランスフェクションし(10% FBSを含むDMEM (SIGMA)培地にて培養中の293細胞にDNA-リン酸カルシウム混液を添加し、6時間後に培地交換)、37、5% CO₂、飽和湿度条件下で48時間培養後にCell Counting Kit-8 (DOJIN)を用いて確認した。

20

その結果、HDAC4ドミナントネガティブ変異体発現(H863L)によるJurkat細胞特異的な細胞増殖阻害が認められた(図9)。各細胞に関して、導入したHDAC発現量は抗Flag抗体(SIGMA, anti Flag M2)を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。

以上より、HDAC4の機能を選択的に阻害することで、T細胞系の増殖が選択的に抑制されることがわかった。

実施例11: HDAC1, 3, 4ドミナントネガティブ変異体発現によるIL-2およびGATA-1転写活性に及ぼす影響

30

実施例6、7、8にて作製したHDAC1, 3, 4のドミナントネガティブ変異体発現時におけるIL-2およびGATA-1転写活性を測定した。

Jurkat細胞(ATCC, TIB-152)に関しては、各種HDACまたはHDAC変異体発現用プラスミド10 μ gをエレクトロポレーション法(BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧300V、電荷975 μ F、400 μ L)により 1×10^7 cellsを形質転換した。形質転換後、2.5 mLの10% FBS (MOREGATE)を含むRPMI 1640 (SIGMA) (10% FBS RPMI 1640)を加え、50 μ L/wellの割合で、96 well white plateに分注した。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で10時間培養後、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, SIGMA)、Ionomycin (SIGMA)、Anti CD28 antibody (Pharmin gen)を10% FBS RPMI 1640で混合した液を50 μ L/wellずつ加え(終濃度それぞれ50 ng/mL、1 μ g/mL、75 ng/mL)、Jurkat細胞を刺激した。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で12時間培養後、Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega)のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンター(1420 MULTILABEL COUNTER ARVO SX, WALLAC)によりIL-2転写活性を測定した。

40

HEL細胞(受託番号JCRB0062、JCRB)に関してはpGL3-HSI-I

50

E Pro 15 μ g および各種 HDAC または HDAC 変異体発現用プラスミド 10 μ g をエレクトロポレーション法 (BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧 1750 V、電荷 10 μ F、365 μ L) により 8.75×10^6 cells を形質転換した。形質転換後、2 mL の 10% FBS RPMI 1640 を加え、50 μ L/well の割合で、96 well white plate に分注した。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で 3 時間培養後、10% FBS RPMI 1640 培地を 50 μ L/well ずつ加えた。37、5% CO₂、飽和湿度条件下で 8 時間培養後、Bright-glo Luciferase Assay System のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンターにより GATA-1 転写活性を測定した。

10

その結果、HDAC 4 ドミナントネガティブ変異体 (H802K H803L, H863L) 発現時のみに IL-2 転写抑制が認められ、その際に GATA-1 転写抑制は認められないことがわかった (図 10)。各細胞に関して、導入した HDAC 発現量は抗 Flag 抗体 (SIGMA, anti Flag M2) を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。

以上より、HDAC 4 の機能を選択的に阻害することで血小板減少を伴わずに免疫機能を抑制することが可能であることが示唆された。

実施例 12 : HDAC 4 の複合体形成

Mol. Cell, Vol. 9, p. 45 - 57, 2002 では、Class II HDACs が N-CoR および HDAC 3 と複合体を形成しており、ヒストンを基質とした HDAC 活性は、Class II HDACs よりも HDAC 3 がはるかに強いと報告されている。そこで、粗精製した Class II HDACs の複合体形成について確認した。

20

HDAC 4, 5, 7 発現用プラスミド 7 μ g をそれぞれ PEAK Rapid 細胞 (Edge BioSystems) にリン酸カルシウム法にてトランスフェクションし、48 時間後、whole cell lysate (25 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1% Triton X-100 中で細胞を破碎、遠心分離により cell debris を除去) を抗 Flag 抗体カラム (SIGMA, anti Flag M2-agarose) にて粗精製した (TBS で wash した後、0.1 M Glycine-HCl pH 3.5 にて溶出)。次いで、粗精製画

30

分を SDS-PAGE 後 CBB 染色した。その結果、導入した HDAC 4, 5, 7 の発現が確認された (図 11)。また、HDAC 4, 5, 7 の粗精製画分それぞれに HDAC 3 および N-CoR が含まれることが、ウエスタンブロッティングにより確認された (抗 HDAC 3 抗体は SIGMA 社、抗 N-CoR 抗体は Santa Cruz 社の製品を使用)。

以上より、粗精製した HDAC 4, 5, 7 は N-CoR および HDAC 3 と複合体を形成していることが確認された。

実施例 13 : HDAC 4 ドミナントネガティブ変異体の複合体形成能

Mol. Cell, Vol. 9, p. 45 - 57, 2002 より、HDAC 4 変異体には N-CoR および HDAC 3 との複合体を形成しないものがあるとの報告がある。そこで、HDAC 4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) の複合体形成能について確認した。

40

野生型 HDAC 4 および HDAC 4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) 発現用プラスミド 7 μ g を PEAK Rapid 細胞 (Edge BioSystems) にリン酸カルシウム法にてトランスフェクションし、48 時間後、whole cell lysate (25 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1% Triton X-100 中で細胞を破碎し、遠心分離により cell debris を除去) を抗 Flag 抗体カラム (SIGMA, anti Flag M2-agarose) にて粗精製した (TBS で洗浄した後、0.1 M Glycine-HCl pH 3.5 にて溶出)。次いで、粗精製画分を SDS-PAGE 後 CBB 染色した

50

。

その結果、導入したHDAC4およびHDAC4ドミナントネガティブ変異体(H863L)の発現が確認された(図12)。また、HDAC4の粗精製画分にHDAC3およびN-CoRが含まれること、HDAC4ドミナントネガティブ変異体(H863L)の粗精製画分にはHDAC3およびN-CoRがほとんど含まれないことが、ウエスタンブロッティングにより確認された(抗HDAC3抗体はSIGMA社、抗N-CoR抗体はSanta Cruz社の製品を使用)。

以上より、野生型HDAC4と比較してHDAC4ドミナントネガティブ変異体(H863L)は、N-CoRおよびHDAC3との複合体形成能が低下していることがわかった。

実施例14: HDAC活性の測定

Mol. Cell, Vol. 9, p. 45 - 57, 2002より、N-CoRおよびHDAC3との複合体形成能が低下しているHDAC4変異体は、ヒストンを基質としたHDAC活性の低下が認められるとの報告がある。そこで、HDAC4ドミナントネガティブ変異体(H802K H803L, H863L)のヒストンを基質としたHDAC活性を測定した。

野生型HDAC4およびHDAC4ドミナントネガティブ変異体(H802K H803L, H863L)発現用プラスミド7 μ gを293T細胞にリン酸カルシウム法にてトランスフェクションし、48時間後、whole cell lysate(25mM Tris pH7.4, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1% Triton X-100中で細胞を破碎、遠心分離によりcell debrisを除去)を抗Flag抗体カラム(SIGMA, anti Flag M2-agarose)にて粗精製し(TBSでwashした後、0.1M Glycine-HCl pH3.5にて溶出)、HDAC活性測定に用いた。反応基質は、[³H]酢酸ナトリウム300MBq(NENTM Life Science Products, Inc.)を含むRPMI(SIGMA)培地40mL中で2時間培養したJurkat細胞(2 \times 10⁸ cells)をLysis buffer pH6.5(10mM Tris-HCl, 50mM Sodium Hydrogensulfate, 1% Triton X-100, 10mM MgCl₂·6H₂O, 8.6% Sucrose)中で破碎し、Wash buffer(10mM Tris-HCl, 13mM EDTA)にて洗浄した後、0.4N H₂SO₄を添加、調製した[³H]ラベルされたアセチル化ヒストンを用いた。

その結果、野生型HDAC4と比較して、HDAC4ドミナントネガティブ変異体(H802K H803L, H863L)ではHDAC活性の低下が認められた(図13)。

以上より、HDAC4ドミナントネガティブ変異体(H802K H803L, H863L)は、N-CoRおよびHDAC3との複合体形成能が低下しており(実施例13)、それに伴ってヒストンを基質としたHDAC活性が低下していることが確認された。

実施例15: HDAC4とN-CoRとの相互作用の検出系の構築

野生型HDAC4と比較して、HDAC4ドミナントネガティブ変異体(H863L)がN-CoRとの複合体形成能が低下していることがわかったため、HDAC4とN-CoRとの相互作用を阻害することで、HDAC4ドミナントネガティブ変異体発現時と同様のIL-2転写抑制作用が発揮されると考えた。

そこで、HDAC4とN-CoRとの相互作用を阻害する薬物のスクリーニング系を構築するため、CheckMate Mammalian Two-Hybrid System(Promega)を利用することとした(図14)。

まず、Mol. Cell, 2002, Vol. 9, p. 45 - 57の文献情報よりヒトN-CoRのRD3配列相当部位を決定した(1005-1498aa)。ヒトN-CoR CDS塩基配列はGenBankのaccession番号AF044209より入手し、ヒト肺由来cDNAからPCR法によりヒトN-CoR(RD3)cDNAを増幅した。プライマーは、下記RD3-Bam-FW(配列番号82)及びRD3-Not-RV(配列番号83)を用いた。ヒトN-CoR(RD3)の塩基配列については配

10

20

30

40

50

列番号 21、ヒト N - C o R (R D 3) の塩基配列がコードするアミノ酸配列については配列番号 22 を参照のこと。得られた P C R 断片をシーケンシングにより確認し (N - C o R (R D 3) に関しては L 1 0 1 4 V の変異が認められたが S W I S S - P R O T にて v a r i a n t としての報告があったため採用とした)、制限酵素処理 (B a m H I / N o t I) によって p B I N D (P r o m e g a) に挿入し、G A L 4 - N - C o R (R D 3) 発現用プラスミドを得た。また、H D A C 4 および H D A C 4 ドミナントネガティブ変異体 (H 8 6 3 L) 全長を制限酵素処理 (X b a I / N o t I) によって p A C T (P r o m e g a) に挿入し、H D A C 4 - V P 1 6 および H D A C 4 (H 8 6 3 L) - V P 1 6 発現用プラスミドを得た。

RD3-Bam-FW: GGGATCCGTGAAGTCCTTCAGCCTGCTCC (配列番号 8 2)

10

RD3-Not-RV: TGGGCGCCCATGGGTGAGCCTCTGGACA (配列番号 8 3)

続いて、p G 5 - L u c (P r o m e g a) 1 0 μ g , p B N D 3 μ g , p A C T 3 μ g または p G 5 - L u c 1 0 μ g , p B N D - N - C o R (R D 3) 3 μ g , p A C T - H D A C 4 3 μ g または p G 5 - L u c 1 0 μ g , p B N D - N - C o R (R D 3) 3 μ g , p A C T - H D A C 4 (H 8 6 3 L) 3 μ g をそれぞれ混和し、エレクトロポレーション法 (B I O - R A D , G e n e P u l s e r I I , 電圧 3 0 0 V 、電荷 9 7 5 μ F 、 4 0 0 μ L) により J u r k a t 細胞 (A T C C , T I B - 1 5 2) 1 × 1 0 ⁷ c e l l s にトランスフェクションした。トランスフェクション 2 2 時間後に B r i g h t - G l o L u c i f e r a s e A s s a y S y s t e m (P r o m e g a) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンター (1 4 2 0 M U L T I L A B E L C O U N T E R A R V O S X , W A L L A C) により測定した。

20

その結果、N - C o R (R D 3) と H D A C 4 の相互作用による G A L 4 転写活性化が検出され、H D A C 4 ドミナントネガティブ変異体 (H 8 6 3 L) が N - C o R (R D 3) と相互作用しないことが確認された (図 1 5) 。

以上より、H D A C 4 と N - C o R (R D 3) との相互作用の検出系が構築できたと判断した。

実施例 1 6 : s i R N A を用いた H D A C 4 選択的な遺伝子発現抑制の I L - 2 及び G A T A - 1 転写活性に及ぼす影響

30

J u r k a t 細胞に、H D A C 4 を標的とする 4 種類の s i R N A の m i x t u r e である s i G E N E H D A C 4 S M A R T p o o l (D h a r m a c o n I n c . 製 , B - B r i d g e i n t e r n a t i o n a l I n c . 販売 , コード番号 M - 0 0 3 4 9 7 - 0 0 - 0 5) または N o n - s p e c i f i c C o n t r o l D u p l e x I X (4 7 % G C c o n t e n t) (D h a r m a c o n I n c . 製 , B - B r i d g e i n t e r n a t i o n a l I n c . 販売 , コード番号 D - 0 0 1 2 0 6 - 0 9 - 2 0) 、及び p G L 3 I L 2 P r o 4 3 を、前述と同様のエレクトロポレーション法により導入し、I L - 2 転写活性を測定した。同様にして、H E L 細胞に、s i G E N E H D A C 4 S M A R T p o o l または N o n - s p e c i f i c C o n t r o l D u p l e x I X 、及び p G L 3 - H S I - I E P r o を導入し、G A T A - 1 転写活性を測定した。なお、J u r k a t 細胞および H E L 細胞における s i R N A の導入条件およびその効果は、p G L 3 - c o n t r o l (P r o m e g a) および L u c i f e r a s e G L 3 D u p l e x (B - B r i d g e : D - 0 0 1 4 0 0 - 0 1 - 2 0) を用いることで予め確認した。

40

その結果、H D A C 4 遺伝子発現の選択的な抑制により I L - 2 転写抑制が認められたが、G A T A - 1 転写抑制は認められなかった (図 1 6) 。

以上より、H D A C 4 の機能を選択的に阻害することで血小板減少を伴わずに免疫機能を抑制し得ることが再度示唆された。

【産業上の利用可能性】

本発明により、各種 H D A C の中でも H D A C 4 / H D A C 8 を選択的に抑制すると、

50

血小板減少作用及び/又はGATA-1産生阻害活性をあまり示すことなく、免疫を抑制し得ること、IL-2産生を阻害し得ること、又は免疫担当細胞の増殖を抑制し得ることが明らかとなった。従って、HDAC4/HDAC8を選択的に抑制する化合物を選択することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、GATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤、又は免疫担当細胞増殖阻害剤を従来よりも簡便かつ短時間で選択することが可能になる。以上より、本発明の方法は新薬創製のための研究に極めて有用である。

本出願は、2002年12月27日に日本で出願された特願2002-378800を基礎としており、その内容は本明細書中に援用される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> New methods for selecting an immunosuppressive agent

<130> 09598

<150> JP2002-378800 10

<151> 2002-12-27

<160> 86

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3255 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3255)

<223> human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 1 30

atg agc tcc caa agc cat cca gat gga ctt tct ggc cga gac cag cca 48

Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro

1 5 10 15

gtg gag ctg ctg aat cct gcc cgc gtg aac cac atg ccc agc acg gtg 96

Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val

20 25 30

gat gtg gcc acg geg ctg cct ctg caa gtg gcc ccc teg gca gtg ccc 144

Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro

35 40 45

40

atg gac ctg cgc ctg gac cac cag ttc tca ctg cct gtg gca gag ccg	192	
Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro		
50 55 60		
gcc ctg cgg gag cag cag ctg cag cag gag ctc ctg gcg ctc aag cag	240	
Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln		
65 70 75 80		
aag cag cag atc cag agg cag atc ctc atc gct gag ttc cag agg cag	288	10
Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln		
85 90 95		
cac gag cag ctc tcc cgg cag cac gag gcg cag ctc cac gag cac atc	336	
His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile		
100 105 110		
aag caa caa cag gag atg ctg gcc atg aag cac cag cag gag ctg ctg	384	20
Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu		
115 120 125		
gaa cac cag cgg aag ctg gag agg cac cgc cag gag cag gag ctg gag	432	
Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu		
130 135 140		
aag cag cac cgg gag cag aag ctg cag cag ctc aag aac aag gag aag	480	30
Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys		
145 150 155 160		
ggc aaa gag agt gcc gtg gcc agc aca gaa gtg aag atg aag tta caa	528	
Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln		
165 170 175		
gaa ttt gtc ctc aat aaa aag aag gcg ctg gcc cac cgg aat ctg aac	576	40
Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn		
180 185 190		

cac tgc att tcc agc gac cct cgc tac tgg tac ggg aaa acg cag cac	624	
His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His		
195	200	205
agt tcc ctt gac cag agt tet cca ccc cag agc gga gtg teg acc tcc	672	
Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser		
210	215	220
tat aac cac ccg gtc ctg gga atg tac gac gcc aaa gat gac ttc cct	720	10
Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro		
225	230	235 240
ctt agg aaa aca gct tet gaa ccg aat ctg aaa tta cgg tcc agg cta	768	
Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu		
245	250	255
aag cag aaa gtg gcc gaa aga cgg agc agc ccc ctg tta cgc agg aaa	816	20
Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys		
260	265	270
gac ggg cca gtg gtc act gct cta aaa aag cgt ccg ttg gat gtc aca	864	
Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr		
275	280	285
gac tcc gcg tgc agc agc gcc cca ggc tcc gga ccc agc tea ccc aac	912	30
Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn		
290	295	300
aac agc tcc ggg agc gtc agc gcg gag aac ggt atc geg ccc gcc gtc	960	
Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val		
305	310	315 320
ccc agc atc ccg gcg gag acg agt ttg gcg cac aga ctt gtg gca cga	1008	40
Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg		
325	330	335
gaa ggc tcg gcc gct cca ctt ccc etc tac aca teg cca tcc ttg ccc	1056	

Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro		
340	345	350
aac atc acg ctg ggc ctg cct gcc acc ggc ccc tet gcg ggc acg geg		1104
Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala		
355	360	365
ggc cag cag gac acc gag aga ctc acc ctt ccc gcc ctc cag cag agg		1152
Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg		10
370	375	380
ctc tcc ctt ttc ccc ggc acc cac ctc act ccc tac ctg agc acc tcg		1200
Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser		
385	390	395
ccc ttg gag cgg gac gga ggg gca gcg cac agc cct ctt ctg cag cac		1248
Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His		20
405	410	415
atg gtc tta ctg gag cag cca ccg gca caa gca ccc ctc gtc aca ggc		1296
Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly		
420	425	430
ctg gga gca ctg ccc ctc cac gca cag tcc ttg gtt ggt gca gac cgg		1344
Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg		30
435	440	445
gtg tcc ccc tcc atc cac aag ctg cgg cag cac cgc cca ctg ggg cgg		1392
Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg		
450	455	460
acc cag tcg gcc ccg ctg ccc cag aac gcc cag gct ctg cag cac ctg		1440
Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu		40
465	470	475
gtc atc cag cag cag cat cag cag ttt ctg gag aaa cac aag cag cag		1488
Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln		

485	490	495		
ttc cag cag cag caa ctg cag atg aac aag atc atc ccc aag cca agc			1536	
Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser				
500	505	510		
gag cca gcc cgg cag ccg gag agc cac ccg gag gag acg gag gag gag			1584	
Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu				10
515	520	525		
ctc cgt gag cac cag gct ctg ctg gac gag ccc tac ctg gac cgg ctg			1632	
Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu				
530	535	540		
ccg ggg cag aag gag gcg cac gca cag gcc ggc gtg cag gtg aag cag			1680	
Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln				20
545	550	555	560	
gag ccc att gag agc gat gag gaa gag gca gag ccc cca cgg gag gtg			1728	
Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val				
565	570	575		
gag ccg ggc cag cgc cag ccc agt gag cag gag ctg ctc ttc aga cag			1776	
Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln				30
580	585	590		
caa gcc ctc ctg ctg gag cag cag cgg atc cac cag ctg agg aac tac			1824	
Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr				
595	600	605		
cag gcg tcc atg gag gcc gcc ggc atc ccc gtg tcc ttc ggc ggc cac			1872	
Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His				40
610	615	620		
agg cct ctg tcc cgg gcg cag tcc tca ccc gcg tct gcc acc ttc ccc			1920	
Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro				
625	630	635	640	

gtg tct gtg cag gag ccc ccc acc aag ccg agg ttc acg aca ggc ctc	1968	
Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu		
645	650	655
gtg tat gac acg ctg atg ctg aag cac cag tgc acc tgc ggg agt agc	2016	
Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser		
660	665	670
agc agc cac ccc gag cac gcc ggg agg atc cag agc atc tgg tcc cgc	2064	10
Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg		
675	680	685
ctg cag gag acg ggc ctc cgg ggc aaa tgc gag tgc atc cgc gga cgc	2112	
Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg		
690	695	700
aag gcc acc ctg gag gag cta cag acg gtg cac tcg gaa gcc cac acc	2160	20
Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr		
705	710	715
ctc ctg tat ggc acg aac ccc ctc aac cgg cag aaa ctg gac agt aag	2208	
Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys		
725	730	735
aaa ctt cta ggc tcg ctc gcc tcc gtg ttc gtc cgg ctc cct tgc ggt	2256	30
Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly		
740	745	750
ggt gtt ggg gtg gac agt gac acc ata tgg aac gag gtg cac tcg gcg	2304	
Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala		
755	760	765
ggg gca gcc cgc ctg gct gtg ggc tgc gtg gta gag ctg gtc ttc aag	2352	40
Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys		
770	775	780

gtg gcc aca ggg gag ctg aag aat ggc ttt gct gtg gtc cgc ccc cct	2400	
Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro		
785	790	795 800
gga cac cat gcg gag gag agc acg ccc atg ggc ttt tgc tac ttc aac	2448	
Gly His His Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn		
	805	810 815
tcc gtg gcc gtg gca gcc aag ctt ctg cag cag agg ttg agc gtg agc	2496	10
Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser		
	820	825 830
aag atc ctc atc gtg gac tgg gac gtg cac cat gga aac ggg acc cag	2544	
Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln		
	835	840 845
cag get ttc tac agc gac cct agc gtc ctg tac atg tcc ctc cac cgc	2592	20
Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu His Arg		
	850	855 860
tac gac gat ggg aac ttc ttc cca ggc agc ggg get cct gat gag gtg	2640	
Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val		
865	870	875 880
ggc aca ggg ccc ggc gtg ggt ttc aac gtc aac atg get ttc acc ggc	2688	
Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly		30
	885	890 895
ggc ctg gac ccc ccc atg gga gac get gag tac ttg gcg gcc ttc aga	2736	
Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg		
	900	905 910
acg gtg gtc atg ccg atc gcc agc gag ttt gcc ccg gat gtg gtg ctg	2784	
Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu		40
	915	920 925
gtg tca tca ggc ttc gat gcc gtg gag ggc cac ccc acc cct ctt ggg	2832	

Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly		
930	935	940
ggc tac aac ctc tcc gcc aga tgc ttc ggg tac ctg acg aag cag ctg		2880
Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Arg Cys Phe Gly Tyr Leu Thr Lys Gln Leu		
945	950	955 960
atg ggc ctg gct ggc gcc cgg att gtc ctg gcc ctc gag gga gcc cac		2928
Met Gly Leu Ala Gly Gly Arg Ile Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly His		
	965	970 975
gac ctg acc gcc att tgc gac gcc tcg gaa gca tgt gtt tct gcc ttg		2976
Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Ser Ala Leu		
	980	985 990
ctg gga aac gag ctt gat cct ctc cca gaa aag gtt tta cag caa aga		3024
Leu Gly Asn Glu Leu Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Leu Gln Gln Arg		
	995	1000 1005
ccc aat gca aac gct gtc cgt tcc atg gag aaa gtc atg gag atc cac		3072
Pro Asn Ala Asn Ala Val Arg Ser Met Glu Lys Val Met Glu Ile His		
	1010	1015 1020
agc aag tac tgg cgc tgc ctg cag cgc aca ace tcc aca gcg ggg cgt		3120
Ser Lys Tyr Trp Arg Cys Leu Gln Arg Thr Thr Ser Thr Ala Gly Arg		
1025	1030	1035 1040
tct ctg atc gag gct cag act tgc gag aac gaa gaa gcc gag acg gtc		3168
Ser Leu Ile Glu Ala Gln Thr Cys Glu Asn Glu Glu Ala Glu Thr Val		
	1045	1050 1055
acc gcc atg gcc tcg ctg tcc gtg gcc gtg aag ccc gcc gaa aag aga		3216
Thr Ala Met Ala Ser Leu Ser Val Gly Val Lys Pro Ala Glu Lys Arg		
	1060	1065 1070
cca gat gag gag ccc atg gaa gag gag ccg ccc ctg tag		3255
Pro Asp Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Pro Pro Leu		

1075

1080

<210> 2

<211> 1084

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

10

Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro
 1 5 10 15

Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val
 20 25 30

Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro
 35 40 45

20

Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro
 50 55 60

Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln
 65 70 75 80

Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln
 85 90 95

30

His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile
 100 105 110

Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu
 115 120 125

40

Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu
 130 135 140

Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys

Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala
 355 360 365

Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg
 370 375 380

Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser
 385 390 395 400

10

Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His
 405 410 415

Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly
 420 425 430

Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg
 435 440 445

20

Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg
 450 455 460

Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu
 465 470 475 480

Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln
 485 490 495

30

Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser
 500 505 510

Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu
 515 520 525

40

Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu
 530 535 540

Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln
 545 550 555 560

Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val
 565 570 575

Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln
 580 585 590

Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr
 595 600 605

Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His
 610 615 620

Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro
 625 630 635 640

Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu
 645 650 655

Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser
 660 665 670

Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg
 675 680 685

Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg
 690 695 700

Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr
 705 710 715 720

Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys
 725 730 735

Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly

10

20

30

40

740

745

750

Gly	Val	Gly	Val	Asp	Ser	Asp	Thr	Ile	Trp	Asn	Glu	Val	His	Ser	Ala
		755					760				765				

Gly	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Gly	Cys	Val	Val	Glu	Leu	Val	Phe	Lys
		770				775					780				

Val	Ala	Thr	Gly	Glu	Leu	Lys	Asn	Gly	Phe	Ala	Val	Val	Arg	Pro	Pro
		785			790					795				800	

10

Gly	His	His	Ala	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Met	Gly	Phe	Cys	Tyr	Phe	Asn
			805						810					815	

Ser	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Leu	Leu	Gln	Gln	Arg	Leu	Ser	Val	Ser
		820							825				830		

20

Lys	Ile	Leu	Ile	Val	Asp	Trp	Asp	Val	His	His	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln
		835					840					845			

Gln	Ala	Phe	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ser	Val	Leu	Tyr	Met	Ser	Leu	His	Arg
		850				855					860				

Tyr	Asp	Asp	Gly	Asn	Phe	Phe	Pro	Gly	Ser	Gly	Ala	Pro	Asp	Glu	Val
		865			870					875				880	

30

Gly	Thr	Gly	Pro	Gly	Val	Gly	Phe	Asn	Val	Asn	Met	Ala	Phe	Thr	Gly
			885						890					895	

Gly	Leu	Asp	Pro	Pro	Met	Gly	Asp	Ala	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ala	Phe	Arg
			900					905					910		

Thr	Val	Val	Met	Pro	Ile	Ala	Ser	Glu	Phe	Ala	Pro	Asp	Val	Val	Leu
		915					920					925			

40

Val	Ser	Ser	Gly	Phe	Asp	Ala	Val	Glu	Gly	His	Pro	Thr	Pro	Leu	Gly
		930				935					940				

<223> Dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4
(HDAC4) gene

<400> 3

atg agc tcc caa agc cat cca gat gga ctt tct ggc cga gac cag cca	48	
Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro		
1 5 10 15		
gtg gag ctg ctg aat cct gcc cgc gtg aac cac atg ccc agc acg gtg	96	10
Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val		
20 25 30		
gat gtg gcc acg gcg ctg cct ctg caa gtg gcc ccc tgg gca gtg ccc	144	
Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro		
35 40 45		
atg gac ctg cgc ctg gac cac cag ttc tca ctg cct gtg gca gag cgg	192	20
Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro		
50 55 60		
gcc ctg cgg gag cag cag ctg cag cag gag ctc ctg gcg ctc aag cag	240	
Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln		
65 70 75 80		
aag cag cag atc cag agg cag atc ctc atc gct gag ttc cag agg cag	288	30
Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln		
85 90 95		
cac gag cag ctc tcc cgg cag cac gag gcg cag ctc cac gag cac atc	336	
His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile		
100 105 110		
aag caa caa cag gag atg ctg gcc atg aag cac cag cag gag ctg ctg	384	
Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu		40
115 120 125		
gaa cac cag cgg aag ctg gag agg cac cgc cag gag cag gag ctg gag	432	

Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu		
130	135	140
aag cag cac egg gag cag aag ctg cag cag ctc aag aac aag gag aag		480
Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys		
145	150	155 160
ggc aaa gag agt gcc gtg gcc agc aca gaa gtg aag atg aag tta caa		528
Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln		
	165	170 175
gaa ttt gtc ctc aat aaa aag aag gcg ctg gcc cac egg aat ctg aac		576
Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn		
	180	185 190
cac tgc att tcc agc gac cct cgc tac tgg tac ggg aaa acg cag cac		624
His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His		
	195	200 205
agt tcc ctt gac cag agt tet cca ccc cag agc gga gtg tgc acc tcc		672
Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser		
	210	215 220
tat aac cac ccg gtc ctg gga atg tac gac gcc aaa gat gac ttc cct		720
Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro		
	225	230 235 240
ctt agg aaa aca gct tct gaa ccg aat ctg aaa tta egg tcc agg cta		768
Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu		
	245	250 255
aag cag aaa gtg gcc gaa aga egg agc agc ccc ctg tta cgc agg aaa		816
Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys		
	260	265 270
gac ggg cca gtg gtc act gct cta aaa aag cgt ccg ttg gat gtc aca		864
Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr		

10

20

30

40

275	280	285		
gac tcc gcg tgc agc agc gcc cca ggc tcc gga ccc agc tca ccc aac			912	
Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn				
290	295	300		
aac agc tcc ggg agc gtc agc gcg gag aac ggt atc gcg ccc gcc gtc			960	
Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val				10
305	310	315	320	
ccc agc atc ccg gcg gag acg agt ttg gcg cac aga ctt gtg gca cga			1008	
Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg				
325	330	335		
gaa ggc tcg gcc gct cca ctt ccc ctc tac aca tcg cca tcc ttg ccc			1056	
Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro				20
340	345	350		
aac atc acg ctg ggc ctg cct gcc acc ggc ccc tct geg ggc acg gcg			1104	
Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala				
355	360	365		
ggc cag cag gac acc gag aga ctc acc ctt ccc gcc ctc cag cag agg			1152	
Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg				30
370	375	380		
ctc tcc ctt ttc ccc gcc acc cac ctc act ccc tac ctg agc acc tcg			1200	
Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser				
385	390	395	400	
ccc ttg gag cgg gac gga ggg gca gcg cac agc cct ctt ctg cag cac			1248	
Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His				40
405	410	415		
atg gtc tta ctg gag cag cca ccg gca caa gca ccc ctc gtc aca ggc			1296	
Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly				
420	425	430		

ctg gga gca ctg ccc ctc cac gca cag tcc ttg gtt ggt gca gac cgg	1344	
Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg		
435	440	445
gtg tcc ccc tcc atc cac aag ctg cgg cag cac cgc cca ctg ggg cgg	1392	
Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg		
450	455	460
acc cag tcg gcc ccg ctg ccc cag aac gcc cag gct ctg cag cac ctg	1440	10
Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu		
465	470	475 480
gtc atc cag cag cag cat cag cag ttt ctg gag aaa cac aag cag cag	1488	
Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln		
485	490	495
ttc cag cag cag caa ctg cag atg aac aag atc atc ccc aag cca agc	1536	20
Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser		
500	505	510
gag cca gcc cgg cag ccg gag agc cac ccg gag gag acg gag gag gag	1584	
Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu		
515	520	525
ctc cgt gag cac cag gct ctg ctg gac gag ccc tac ctg gac cgg ctg	1632	30
Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu		
530	535	540
ccg ggg cag aag gag gcg cac gca cag gcc ggc gtg cag gtg aag cag	1680	
Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln		
545	550	555 560
gag ccc att gag agc gat gag gaa gag gca gag ccc cca cgg gag gtg	1728	40
Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val		
565	570	575

gag ccg ggc cag cgc cag ccc agt gag cag gag ctg ctc ttc aga cag	1776	
Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln		
580 585 590		
caa gcc ctc ctg ctg gag cag cag cgg atc cac cag ctg agg aac tac	1824	
Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr		
595 600 605		
cag gcg tcc atg gag gcc gcc ggc atc ccc gtg tcc ttc ggc ggc cac	1872	10
Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His		
610 615 620		
agg cct ctg tcc cgg gcg cag tcc tca ccc gcg tct gcc acc ttc ccc	1920	
Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro		
625 630 635 640		
gtg tct gtg cag gag ccc ccc acc aag cgg agg ttc acg aca ggc ctc	1968	20
Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu		
645 650 655		
gtg tat gac acg ctg atg ctg aag cac cag tgc acc tgc ggg agt agc	2016	
Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser		
660 665 670		
age age cac ccc gag cac gcc ggg agg atc cag age atc tgg tcc cgc	2064	30
Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg		
675 680 685		
ctg cag gag acg ggc ctc cgg ggc aaa tgc gag tgc atc cgc gga cgc	2112	
Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg		
690 695 700		
aag gcc acc ctg gag gag cta cag acg gtg cac tcg gaa gcc cac acc	2160	40
Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr		
705 710 715 720		
ctc ctg tat ggc acg aac ccc ctc aac cgg cag aaa ctg gac agt aag	2208	

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

865	870	875	880	
ggc aca ggg ccc ggc gtg ggt ttc aac gtc aac atg gct ttc acc ggc				2688
Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly				
	885	890	895	
ggc ctg gac ccc ccc atg gga gac gct gag tac ttg gcg gcc ttc aga				2736
Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg				
	900	905	910	10
acg gtg gtc atg ccg atc gcc agc gag ttt gcc ccg gat gtg gtg ctg				2784
Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu				
	915	920	925	
gtg tca tca ggc ttc gat gcc gtg gag ggc cac ccc acc cct ctt ggg				2832
Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly				
	930	935	940	20
ggc tac aac ctc tcc gcc aga tgc ttc ggg tac ctg acg aag cag ctg				2880
Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Arg Cys Phe Gly Tyr Leu Thr Lys Gln Leu				
	945	950	955	960
atg ggc ctg gct ggc ggc cgg att gtc ctg gcc ctc gag gga ggc cac				2928
Met Gly Leu Ala Gly Gly Arg Ile Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly His				
	965	970	975	30
gac ctg acc gcc att tgc gac gcc tcg gaa gca tgt gtt tct gcc ttg				2976
Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Ser Ala Leu				
	980	985	990	
ctg gga aac gag ctt gat cct ctc cca gaa aag gtt tta cag caa aga				3024
Leu Gly Asn Glu Leu Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Leu Gln Gln Arg				
	995	1000	1005	40
ccc aat gca aac gct gtc cgt tcc atg gag aaa gtc atg gag atc cac				3072
Pro Asn Ala Asn Ala Val Arg Ser Met Glu Lys Val Met Glu Ile His				
	1010	1015	1020	

agc aag tac tgg cgc tgc ctg cag cgc aca acc tcc aca gcg tct ctg 3120
 Ser Lys Tyr Trp Arg Cys Leu Gln Arg Thr Thr Ser Thr Ala Gly Arg
 1025 1030 1035 1040

tct ctg atc gag gct cag act tgc gag aac gaa gaa gcc gag acg gtc 3168
 Ser Leu Ile Glu Ala Gln Thr Cys Glu Asn Glu Glu Ala Glu Thr Val
 1045 1050 1055

acc gcc atg gcc tgc ctg tcc gtg ggc gtg aag ccc gcc gaa aag aga 3216 10
 Thr Ala Met Ala Ser Leu Ser Val Gly Val Lys Pro Ala Glu Lys Arg
 1060 1065 1070

cca gat gag gag ccc atg gaa gag gag ccc ccc ctg tag 3255
 Pro Asp Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Pro Pro Leu
 1075 1080

<210> 4

<211> 1084

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4
 (HDAC4) gene

<400> 4

Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro
 1 5 10 15

Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val
 20 25 30

Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro
 35 40 45

20

30

40

Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro
 50 55 60

Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln
 65 70 75 80

Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln
 85 90 95

10

His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile
 100 105 110

Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu
 115 120 125

Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu
 130 135 140

20

Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys
 145 150 155 160

Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln
 165 170 175

Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn
 180 185 190

30

His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His
 195 200 205

Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser
 210 215 220

40

Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro
 225 230 235 240

Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu

	245	250	255	
Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys				
	260	265	270	
Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr				
	275	280	285	
Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn				10
	290	295	300	
Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val				
	305	310	315	320
Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg				
	325	330	335	20
Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro				
	340	345	350	
Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala				
	355	360	365	
Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg				
	370	375	380	30
Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser				
	385	390	395	400
Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His				
	405	410	415	
Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly				
	420	425	430	40
Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg				
	435	440	445	

Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg
 450 455 460

Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu
 465 470 475 480

Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln
 485 490 495

10

Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser
 500 505 510

Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu
 515 520 525

Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu
 530 535 540

20

Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln
 545 550 555 560

Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val
 565 570 575

Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln
 580 585 590

30

Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr
 595 600 605

Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His
 610 615 620

40

Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro
 625 630 635 640

Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu
 645 650 655

Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser
 660 665 670

Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg
 675 680 685

10

Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg
 690 695 700

Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr
 705 710 715 720

Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys
 725 730 735

20

Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly
 740 745 750

Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala
 755 760 765

Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys
 770 775 780

30

Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro
 785 790 795 800

Gly Lys Leu Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn
 805 810 815

40

Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser
 820 825 830

Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln

835	840	845	
Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu His Arg			
850	855	860	
Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val			
865	870	875	880
Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly			10
	885	890	895
Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg			
	900	905	910
Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu			
	915	920	925
			20
Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly			
930	935	940	
Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Arg Cys Phe Gly Tyr Leu Thr Lys Gln Leu			
945	950	955	960
Met Gly Leu Ala Gly Gly Arg Ile Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly His			
	965	970	975
			30
Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Ser Ala Leu			
	980	985	990
Leu Gly Asn Glu Leu Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Leu Gln Gln Arg			
	995	1000	1005
Pro Asn Ala Asn Ala Val Arg Ser Met Glu Lys Val Met Glu Ile His			
	1010	1015	1020
			40
Ser Lys Tyr Trp Arg Cys Leu Gln Arg Thr Thr Ser Thr Ala Gly Arg			
1025	1030	1035	1040

Ser Leu Ile Glu Ala Gln Thr Cys Glu Asn Glu Glu Ala Glu Thr Val
 1045 1050 1055

Thr Ala Met Ala Ser Leu Ser Val Gly Val Lys Pro Ala Glu Lys Arg
 1060 1065 1070

Pro Asp Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Pro Pro Leu
 1075 1080

10

<210> 5

<211> 3255

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> CDS

20

<222> (1).. (3255)

<223> Dominant negative mutant (H863L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4)
 gene

<400> 5

atg age tcc caa agc cat cca gat gga ctt tct ggc cga gac cag cca 48
 Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro
 1 5 10 15

30

gtg gag ctg ctg aat cct gcc cgc gtg aac cac atg ccc agc acg gtg 96
 Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val
 20 25 30

gat gtg gcc acg gcg ctg cct ctg caa gtg gcc ecc teg gca gtg ccc 144
 Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro
 35 40 45

40

atg gac ctg cgc ctg gac cac cag ttc tca ctg cct gtg gca gag ccg 192
 Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro

50	55	60		
gcc ctg cgg gag cag cag ctg cag cag gag ctc ctg gcg ctc aag cag			240	
Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln				
65	70	75	80	
aag cag cag atc cag agg cag atc ctc atc gct gag ttc cag agg cag			288	
Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln				
	85	90	95	10
cac gag cag ctc tcc cgg cag cac gag gcg cag ctc cac gag cac atc			336	
His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile				
	100	105	110	
aag caa caa cag gag atg ctg gcc atg aag cac cag cag gag ctg ctg			384	
Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu				
	115	120	125	20
gaa cac cag cgg aag ctg gag agg cac cgc cag gag cag gag ctg gag			432	
Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu				
	130	135	140	
aag cag cac cgg gag cag aag ctg cag cag ctc aag aac aag gag aag			480	
Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys				
145	150	155	160	30
ggc aaa gag agt gcc gtg gcc agc aca gaa gtg aag atg aag tta caa			528	
Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln				
	165	170	175	
gaa ttt gtc ctc aat aaa aag aag gcg ctg gcc cac cgg aat ctg aac			576	
Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn				
	180	185	190	40
cac tgc att tcc agc gac cct cgc tac tgg tac ggg aaa acg cag cac			624	
His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His				
	195	200	205	

agt tcc ctt gac cag agt tct cca ccc cag agc gga gtg tgc acc tcc	672	
Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser		
210 215 220		
tat aac cac ccg gtc ctg gga atg tac gac gcc aaa gat gac ttc cct	720	
Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro		
225 230 235 240		
ctt agg aaa aca gct tct gaa ccg aat ctg aaa tta cgg tcc agg cta	768	10
Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu		
245 250 255		
aag cag aaa gtg gcc gaa aga cgg agc agc ccc ctg tta cgc agg aaa	816	
Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys		
260 265 270		
gac ggg cca gtg gtc act gct cta aaa aag cgt ccg ttg gat gtc aca	864	20
Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr		
275 280 285		
gac tcc gcg tgc agc agc gcc cca gcc tcc gga ccc agc tca ccc aac	912	
Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn		
290 295 300		
aac agc tcc ggg agc gtc agc gcg gag aac ggt atc gcg ccc gcc gtc	960	30
Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val		
305 310 315 320		
ccc agc atc ccg gcg gag acg agt ttg gcg cac aga ctt gtg gca cga	1008	
Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg		
325 330 335		
gaa gcc tgc gcc gct cca ctt ccc ctc tac aca tgc cca tcc ttg ccc	1056	40
Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro		
340 345 350		

aac atc acg ctg ggc ctg cct gcc acc ggc ccc tct gcg ggc acg geg	1104	
Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala		
355 360 365		
ggc cag cag gac acc gag aga ctc acc ctt ccc gcc ctc cag cag agg	1152	
Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg		
370 375 380		
ctc tcc ctt ttc ccc ggc acc cac ctc act ccc tac ctg age acc teg	1200	10
Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser		
385 390 395 400		
ccc ttg gag cgg gac gga ggg gca gcg cac agc cct ctt ctg cag cac	1248	
Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His		
405 410 415		
atg gtc tta ctg gag cag cca ccg gca caa gca ccc ctc gtc aca ggc	1296	20
Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly		
420 425 430		
ctg gga gca ctg ccc ctc cac gca cag tcc ttg gtt ggt gca gac cgg	1344	
Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg		
435 440 445		
gtg tcc ccc tcc atc cac aag ctg cgg cag cac cgc cca ctg ggg cgg	1392	30
Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg		
450 455 460		
acc cag tcg gcc ccg ctg ccc cag aac gcc cag gct ctg cag cac ctg	1440	
Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu		
465 470 475 480		
gtc atc cag cag cag cat cag cag ttt ctg gag aaa cac aag cag cag	1488	40
Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln		
485 490 495		
ttc cag cag cag caa ctg cag atg aac aag atc atc ccc aag cca agc	1536	

Phe	Gln	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Met	Asn	Lys	Ile	Ile	Pro	Lys	Pro	Ser				
			500					505					510						
gag cca gcc cgg cag ccg gag agc cac ccg gag gag acg gag gag gag																1584			
Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu																			
			515					520					525						
ctc cgt gag cac cag gct ctg ctg gac gag ccc tac ctg gac cgg ctg																1632			
Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu																	10		
			530					535				540							
ccg ggg cag aag gag gcg cac gca cag gcc ggc gtg cag gtg aag cag																1680			
Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln																			
			545					550				555							560
gag ccc att gag agc gat gag gaa gag gca gag ccc cca cgg gag gtg																1728			
Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val																	20		
								565											575
gag ccg ggc cag cgc cag ccc agt gag cag gag ctg ctc ttc aga cag																1776			
Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln																			
								580											590
caa gcc ctc ctg ctg gag cag cag cgg atc cac cag ctg agg aac tac																1824			
Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr																	30		
								595											605
cag gcg tcc atg gag gcc gcc ggc atc ccc gtg tcc ttc ggc ggc cac																1872			
Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His																			
								610											620
agg cct ctg tcc cgg gcg cag tcc tca ccc gcg tct gcc acc ttc ccc																1920			
Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro																	40		
								625											640
gtg tot gtg cag gag ccc ccc acc aag ccg agg ttc acg aca ggc ctc																1968			
Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu																			

645	650	655		
gtg tat gac acg ctg atg ctg aag cac cag tgc acc tgc ggg agt agc			2016	
Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser				
660	665	670		
agc agc cac ccc gag cac gcc ggg agg atc cag agc atc tgg tcc cgc			2064	
Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg				
675	680	685		10
ctg cag gag acg ggc ctc egg ggc aaa tgc gag tgc atc cgc gga cgc			2112	
Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg				
690	695	700		
aag gcc acc ctg gag gag cta cag acg gtg cac tcg gaa gcc cac acc			2160	
Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr				
705	710	715	720	20
ctc ctg tat ggc acg aac ccc ctc aac egg cag aaa ctg gac agt aag			2208	
Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys				
725	730	735		
aaa ctt cta ggc tcg ctc gcc tcc gtg ttc gtc egg ctc cct tgc ggt			2256	
Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly				
740	745	750		30
ggt gtt ggg gtg gac agt gac acc ata tgg aac gag gtg cac tcg gcg			2304	
Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala				
755	760	765		
ggg gca gcc cgc ctg gct gtg ggc tgc gtg gta gag ctg gtc ttc aag			2352	
Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys				
770	775	780		
gtg gcc aca ggg gag ctg aag aat ggc ttt gct gtg gtc cgc ccc cct			2400	
Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro				
785	790	795	800	40

gga cac cat gcg gag gag agc acg ccc atg ggc ttt tgc tac ttc aac	2448	
Gly His His Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn		
805	810	815
tcc gtg gcc gtg gca gcc aag ctt ctg cag cag agg ttg agc gtg agc	2496	
Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser		
820	825	830
aag atc etc atc gtg gac tgg gac gtg cac cat gga aac ggg acc cag	2544	10
Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln		
835	840	845
cag gct ttc tac agc gac cct agc gtc ctg tac atg tcc etc ctt cgc	2592	
Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu Leu Arg		
850	855	860
tac gac gat ggg aac ttc ttc cca ggc agc ggg gct cct gat gag gtg	2640	20
Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val		
865	870	880
ggc aca ggg ccc ggc gtg ggt ttc aac gtc aac atg gct ttc acc ggc	2688	
Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly		
885	890	895
ggc ctg gac ccc ccc atg gga gac gct gag tac ttg gcg gcc ttc aga	2736	30
Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg		
900	905	910
acg gtg gtc atg ccg atc gcc agc gag ttt gcc ccg gat gtg gtg ctg	2784	
Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu		
915	920	925
gtg tca tca ggc ttc gat gcc gtg gag ggc cac ccc acc cct ctt ggg	2832	
Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly		40
930	935	940

<210> 6

<211> 1084

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Dominant negative mutant (H863L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

10

<400> 6

Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro
1 5 10 15

Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val
20 25 30

Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro
35 40 45

20

Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro
50 55 60

Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln
65 70 75 80

Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln
85 90 95

30

His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile
100 105 110

Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu
115 120 125

Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu
130 135 140

40

Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys
 145 150 155 160

Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln
 165 170 175

Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn
 180 185 190

10

His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His
 195 200 205

Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser
 210 215 220

Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro
 225 230 235 240

20

Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu
 245 250 255

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

Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr
 275 280 285

30

Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn
 290 295 300

Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val
 305 310 315 320

40

Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg
 325 330 335

Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro

340	345	350	
Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala			
355	360	365	
Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg			
370	375	380	
Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser			10
385	390	395	
Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His			
405	410	415	
Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly			
420	425	430	20
Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg			
435	440	445	
Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg			
450	455	460	
Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu			
465	470	475	30
Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln			
485	490	495	
Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser			
500	505	510	
Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu			
515	520	525	40
Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu			
530	535	540	

Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln
 545 550 555 560

Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val
 565 570 575

Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln
 580 585 590

Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr
 595 600 605

Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His
 610 615 620

Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro
 625 630 635 640

Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu
 645 650 655

Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser
 660 665 670

Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg
 675 680 685

Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg
 690 695 700

Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr
 705 710 715 720

Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys
 725 730 735

10

20

30

40

Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly
 740 745 750

Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala
 755 760 765

Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys
 770 775 780

10

Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro
 785 790 795 800

Gly His His Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn
 805 810 815

Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser
 820 825 830

20

Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln
 835 840 845

Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu Leu Arg
 850 855 860

Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val
 865 870 875 880

30

Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly
 885 890 895

Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg
 900 905 910

40

Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu
 915 920 925

Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly

930		935		940	
Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Arg Cys Phe Gly Tyr Leu Thr Lys Gln Leu					
945		950		955	960
Met Gly Leu Ala Gly Gly Arg Ile Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly His					
		965		970	975
Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Ser Ala Leu					10
		980		985	990
Leu Gly Asn Glu Leu Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Leu Gln Gln Arg					
		995		1000	1005
Pro Asn Ala Asn Ala Val Arg Ser Met Glu Lys Val Met Glu Ile His					
		1010		1015	1020
					20
Ser Lys Tyr Trp Arg Cys Leu Gln Arg Thr Thr Ser Thr Ala Gly Arg					
1025		1030		1035	1040
Ser Leu Ile Glu Ala Gln Thr Cys Glu Asn Glu Glu Ala Glu Thr Val					
		1045		1050	1055
Thr Ala Met Ala Ser Leu Ser Val Gly Val Lys Pro Ala Glu Lys Arg					
		1060		1065	1070
					30
Pro Asp Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Pro Pro Leu					
		1075		1080	

<210> 7

<211> 1743

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(1176)

<223> human histone deacetylase-8 (HDAC8) gene

<400> 7

gccagatctg gaaggtggct gcggaacggg ttttaagcggg ag atg gag gag cgg	54	
Met Glu Glu Pro		
1		
gag gaa cgg gcg gac agt ggg cag tgg ctg gtc cgg gtt tat atc tat	102	10
Glu Glu Pro Ala Asp Ser Gly Gln Ser Leu Val Pro Val Tyr Ile Tyr		
5 10 15 20		
agt ccc gag tat gtc agt atg tgt gac tcc ctg gcc aag atc ccc aaa	150	
Ser Pro Glu Tyr Val Ser Met Cys Asp Ser Leu Ala Lys Ile Pro Lys		
25 30 35		
cgg gcc agt atg gtg cat tct ttg att gaa gca tat gca ctg cat aag	198	20
Arg Ala Ser Met Val His Ser Leu Ile Glu Ala Tyr Ala Leu His Lys		
40 45 50		
cag atg agg ata gtt aag cct aaa gtg gcc tcc atg gag gag atg gcc	246	
Gln Met Arg Ile Val Lys Pro Lys Val Ala Ser Met Glu Glu Met Ala		
55 60 65		
acc ttc cac act gat gct tat ctg cag cat ctc cag aag gtc agc caa	294	30
Thr Phe His Thr Asp Ala Tyr Leu Gln His Leu Gln Lys Val Ser Gln		
70 75 80		
gag ggc gat gat gat cat cgg gac tcc ata gaa tat ggg cta ggt tat	342	
Glu Gly Asp Asp Asp His Pro Asp Ser Ile Glu Tyr Gly Leu Gly Tyr		
85 90 95 100		
gac tgc cca gcc act gaa ggg ata ttt gac tat gca gca gct ata gga	390	40
Asp Cys Pro Ala Thr Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Ala Ala Ala Ile Gly		
105 110 115		
ggg gct acg atc aca gct gcc caa tgc ctg att gac gga atg tgc aaa	438	

Gly Ala Thr Ile Thr Ala Ala Gln Cys Leu Ile Asp Gly Met Cys Lys		
120	125	130
gta gca att aac tgg tct gga ggg tgg cat cat gca aag aaa gat gaa	486	
Val Ala Ile Asn Trp Ser Gly Gly Trp His His Ala Lys Lys Asp Glu		
135	140	145
gca tct ggt ttt tgt tat ctc aat gat gct gtc ctg gga ata tta cga	534	
Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Leu Asn Asp Ala Val Leu Gly Ile Leu Arg		10
150	155	160
ttg cga cgg aaa ttt gag cgt att ctc tac gtg gat ttg gat ctg cac	582	
Leu Arg Arg Lys Phe Glu Arg Ile Leu Tyr Val Asp Leu Asp Leu His		
165	170	175
cat gga gat ggt gta gaa gac gca ttc agt ttc acc tcc aaa gtc atg	630	
His Gly Asp Gly Val Glu Asp Ala Phe Ser Phe Thr Ser Lys Val Met		20
185	190	195
acc gtg tcc ctg cac aaa ttc tcc cca gga ttt ttc cca gga aca ggt	678	
Thr Val Ser Leu His Lys Phe Ser Pro Gly Phe Phe Pro Gly Thr Gly		
200	205	210
gac gtg tct gat gtt ggc cta ggg aag gga cgg tac tac agt gta aat	726	
Asp Val Ser Asp Val Gly Leu Gly Lys Gly Arg Tyr Tyr Ser Val Asn		30
215	220	225
gtg ccc att cag gat ggc ata caa gat gaa aaa tat tac cag atc tgt	774	
Val Pro Ile Gln Asp Gly Ile Gln Asp Glu Lys Tyr Tyr Gln Ile Cys		
230	235	240
gaa agt gta cta aag gaa gta tac caa gcc ttt aat ccc aaa gca gtg	822	
Glu Ser Val Leu Lys Glu Val Tyr Gln Ala Phe Asn Pro Lys Ala Val		40
245	250	255
gtc tta cag ctg gga gct gac aca ata gct ggg gat ccc atg tgc tcc	870	
Val Leu Gln Leu Gly Ala Asp Thr Ile Ala Gly Asp Pro Met Cys Ser		

265	270	275		
ttt aac atg act cca gtg gga att ggc aag tgt ctt aag tac atc ctt			918	
Phe Asn Met Thr Pro Val Gly Ile Gly Lys Cys Leu Lys Tyr Ile Leu				
280	285	290		
caa tgg cag ttg gca aca ctc att ttg gga gga gga ggc tat aac ctt			966	
Gln Trp Gln Leu Ala Thr Leu Ile Leu Gly Gly Gly Tyr Asn Leu				
295	300	305		10
gcc aac acg gct cga tgc tgg aca tac ttg acc ggg gtc atc cta ggg			1014	
Ala Asn Thr Ala Arg Cys Trp Thr Tyr Leu Thr Gly Val Ile Leu Gly				
310	315	320		
aaa aca cta tcc tet gag atc cca gat cat gag ttt ttc aca gca tat			1062	
Lys Thr Leu Ser Ser Glu Ile Pro Asp His Glu Phe Phe Thr Ala Tyr				
325	330	335	340	20
ggt cct gat tat gtg ctg gaa atc acg cca agc tgc cgg cca gac cgc			1110	
Gly Pro Asp Tyr Val Leu Glu Ile Thr Pro Ser Cys Arg Pro Asp Arg				
345	350	355		
aat gag ccc cac cga atc caa caa atc ctc aac tac atc aaa ggg aat			1158	
Asn Glu Pro His Arg Ile Gln Gln Ile Leu Asn Tyr Ile Lys Gly Asn				
360	365	370		30
ctg aag cat gtg gtc tag ttgacagaaa gagatcaggt ttccagagct			1206	
Leu Lys His Val Val				
375				
gaggagtggg gcctataatg aagacagcgt gtttatgcaa gcagtttgtg gaatttgtga			1266	
ctgcagggaa aatttgaag aaattacttc ctgaaaattt ccaaggggca tcaagtggca			1326	
gctggcttcc tggggtgaag aggcaggcac cccagagtcc tcaactggac ctaggggaag			1386	
aaggagatat cccacattta aagttcttat ttaaaaaaac acacacacac aatgaaatt			1446	40

tttaatcttt gaaaattatt ttttagcgaa ttggggaggg gagtatttta atcatcttaa 1506
 atgaaacaga tcagaagctg gatgagagca gtcaccagtt tntagggcag gaggcagctg 1566
 agaggcaggg tttgggcctc aggaccatec aggtggagcc ctgggagaga ggtaactgat 1626
 cagcagactg ggaggtgggg agaagtccgc tgggtttggt ttagtggtat atatctttgg 1686
 ttttttaat aaaatctttg aaaacctaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1743

10

<210> 8

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Val Tyr Ile Tyr Ser Pro Glu Tyr Val Ser Met Cys Asp Ser Leu Ala
 20 25 30

Lys Ile Pro Lys Arg Ala Ser Met Val His Ser Leu Ile Glu Ala Tyr
 35 40 45

Ala Leu His Lys Gln Met Arg Ile Val Lys Pro Lys Val Ala Ser Met
 50 55 60

Glu Glu Met Ala Thr Phe His Thr Asp Ala Tyr Leu Gln His Leu Gln
 65 70 75 80

20

30

40

Lys Val Ser Gln Glu Gly Asp Asp Asp His Pro Asp Ser Ile Glu Tyr
 85 90 95

Gly Leu Gly Tyr Asp Cys Pro Ala Thr Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Ala
 100 105 110

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

10

Gly Met Cys Lys Val Ala Ile Asn Trp Ser Gly Gly Trp His His Ala
 130 135 140

Lys Lys Asp Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Leu Asn Asp Ala Val Leu
 145 150 155 160

20

Gly Ile Leu Arg Leu Arg Arg Lys Phe Glu Arg Ile Leu Tyr Val Asp
 165 170 175

Leu Asp Leu His His Gly Asp Gly Val Glu Asp Ala Phe Ser Phe Thr
 180 185 190

30

Ser Lys Val Met Thr Val Ser Leu His Lys Phe Ser Pro Gly Phe Phe
 195 200 205

Pro Gly Thr Gly Asp Val Ser Asp Val Gly Leu Gly Lys Gly Arg Tyr
 210 215 220

40

Tyr Ser Val Asn Val Pro Ile Gln Asp Gly Ile Gln Asp Glu Lys Tyr
 225 230 235 240

Tyr Gln Ile Cys Glu Ser Val Leu Lys Glu Val Tyr Gln Ala Phe Asn
 245 250 255

Pro Lys Ala Val Val Leu Gln Leu Gly Ala Asp Thr Ile Ala Gly Asp
 260 265 270

10

Pro Met Cys Ser Phe Asn Met Thr Pro Val Gly Ile Gly Lys Cys Leu
 275 280 285

Lys Tyr Ile Leu Gln Trp Gln Leu Ala Thr Leu Ile Leu Gly Gly Gly
 290 295 300

20

Gly Tyr Asn Leu Ala Asn Thr Ala Arg Cys Trp Thr Tyr Leu Thr Gly
 305 310 315 320

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

30

Phe Thr Ala Tyr Gly Pro Asp Tyr Val Leu Glu Ile Thr Pro Ser Cys
 340 345 350

Arg Pro Asp Arg Asn Glu Pro His Arg Ile Gln Gln Ile Leu Asn Tyr
 355 360 365

40

Ile Lys Gly Asn Leu Lys His Val Val

<210> 9
 <211> 1449
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1449)
 <223> human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene 10
 <400> 9
 atg gcg cag acg cag ggc acc cgg agg aaa gtc tgt tac tac tac gac 48
 Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp
 1 5 10 15
 ggg gat gtt gga aat tac tat tat gga caa ggc cac cca atg aag cct 96
 Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro 20
 20 25 30
 cac cga atc cgc atg act cat aat ttg ctg ctc aac tat ggt ctc tac 144
 His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr
 35 40 45
 cga aaa atg gaa atc tat cgc cct cac aaa gcc aat gct gag gag atg 192
 Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met 30
 50 55 60
 acc aag tac cac agc gat gac tac att aaa ttc ttg cgc tcc atc cgt 240
 Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg
 65 70 75 80
 cca gat aac atg tcg gag tac agc aag cag atg cag aga ttc aac gtt 288
 Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val 40
 85 90 95

ggt gag gac tgt cca gta ttc gat ggc ctg ttt gag ttc tgt cag ttg	336	
Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu		
100 105 110		
tct act ggt ggt tct gtg gca agt gct gtg aaa ctt aat aag cag cag	384	
Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln		
115 120 125		
acg gac atc gct gtg aat tgg gct ggg ggc ctg cac cat gca aag aag	432	10
Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys		
130 135 140		
tcc gag gca tct ggc ttc tgt tac gtc aat gat atc gtc ttg gcc atc	480	
Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile		
145 150 155 160		
ctg gaa ctg cta aag tat cac cag agg gtg ctg tac att gac att gat	528	20
Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp		
165 170 175		
att cac cat ggt gac ggc gtg gaa gag gcc ttc tac acc acg gac cgg	576	
Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg		
180 185 190		
gtc atg act gtg tcc ttt cat aag tat gga gag tac ttc cca gga act	624	30
Val Met Thr Val Ser Phe His Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr		
195 200 205		
ggg gac cta cgg gat atc ggg gct ggc aaa ggc aag tat tat gct gtt	672	
Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val		
210 215 220		
aac tac ccg ctc cga gac ggg att gat gac gag tcc tat gag gcc att	720	40
Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile		
225 230 235 240		

ttc aag ccg gtc atg tcc aaa gta atg gag atg ttc cag cct agt gcg	768	
Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala		
245 250 255		
gtg gtc tta cag tgt ggc tca gac tcc cta tct ggg gat cgg tta ggt	816	
Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly		
260 265 270		
tgc ttc aat cta act atc aaa gga cac gcc aag tgt gtg gaa ttt gtc	864	10
Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val		
275 280 285		
aag agc ttt aac ctg cct atg ctg atg ctg gga ggc ggt ggt tac acc	912	
Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr		
290 295 300		
att cgt aac gtt gcc cgg tgc agg aca tat gag aca gct gtg gcc ctg	960	20
Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu		
305 310 315 320		
gat acg gag atc cct aat gag ctt cca tac aat gac tac ttt gaa tac	1008	
Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr		
325 330 335		
ttt gga cca gat ttc aag ctc cac atc agt cct tcc aat atg act aac	1056	30
Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn		
340 345 350		
cag aac acg aat gag tac ctg gag aag atc aaa cag cga ctg ttt gag	1104	
Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu		
355 360 365		
aac ctt aga atg ctg ccg cac gca cct ggg gtc caa atg cag gcg att	1152	40
Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile		
370 375 380		
cct gag gac gcc atc cct gag gag agt ggc gat gag gac gaa gac gac	1200	

Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp		
385	390	400
cct gac aag cgc atc tcg atc tgc tcc tct gac aaa cga att gcc tgt	1248	
Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys		
	405	410
gag gaa gag ttc tcc gat tct gaa gag gag gga gag ggg ggc cgc aag	1296	
Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys		10
	420	425
aac tct tcc aac ttc aaa aaa gcc aag aga gtc aaa aca gag gat gaa	1344	
Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu		
	435	440
aaa gag aaa gac cca gag gag aag aaa gaa gtc acc gaa gag gag aaa	1392	
Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys		20
	450	455
acc aag gag gag aag cca gaa gcc aaa ggg gtc aag gag gag gtc aag	1440	
Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys		
	465	470
ttg gcc tga	1449	
Leu Ala		30
<210> 10		
<211> 482		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		40
<400> 10		
Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp		
1	5	10
		15

Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro
 20 25 30

His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr
 35 40 45

Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met
 50 55 60

10

Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg
 65 70 75 80

Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val
 85 90 95

20

Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu
 100 105 110

Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln
 115 120 125

30

Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys
 130 135 140

Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile
 145 150 155 160

40

Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp
 165 170 175

Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg
 180 185 190

Val Met Thr Val Ser Phe His Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr
 195 200 205

10

Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val
 210 215 220

Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile
 225 230 235 240

20

Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala
 245 250 255

Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly
 260 265 270

30

Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val
 275 280 285

Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr
 290 295 300

40

Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu

305

310

315

320

Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr
 325 330 335

Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn
 340 345 350

10

Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu
 355 360 365

Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile
 370 375 380

20

Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp
 385 390 395 400

Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys
 405 410 415

30

Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys
 420 425 430

Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu
 435 440 445

40

Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys
 450 455 460

Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys
 465 470 475 480

Leu Ala

<210> 11 10
 <211> 1449
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1449)
 <223> Dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 20
 (HDAC1) gene

<400> 11

atg gcg cag acg cag ggc acc cgg agg aaa gtc tgt tac tac tac gac 48
 Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp
 1 5 10 15

ggg gat gtt gga aat tac tat tat gga caa ggc cac cca atg aag cct 96
 Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro 30
 20 25 30

cac cga atc cgc atg act cat aat ttg ctg ctc aac tat ggt ctc tac 144
 His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr
 35 40 45

cga aaa atg gaa atc tat cgc cct cac aaa gcc aat gct gag gag atg 192
 Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met 40
 50 55 60

acc aag tac cac agc gat gac tac att aaa ttc ttg cgc tcc atc cgt	240	
Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg		
65	70	75 80
cca gat aac atg tcg gag tac agc aag cag atg cag aga ttc aac gtt	288	
Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val		
	85	90 95
ggt gag gac tgt cca gta ttc gat ggc ctg ttt gag ttc tgt cag ttg	336	10
Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu		
	100	105 110
tct act ggt ggt tct gtg gca agt gct gtg aaa ctt aat aag cag cag	384	
Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln		
	115	120 125
acg gac atc gct gtg aat tgg gct ggg ggc ctg aag ctt gca aag aag	432	20
Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu Lys Leu Ala Lys Lys		
	130	135 140
tcc gag gca tct ggc ttc tgt tac gtc aat gat atc gtc ttg gcc atc	480	
Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile		
	145	150 155 160
ctg gaa ctg cta aag tat cac cag agg gtg ctg tac att gac att gat	528	30
Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp		
	165	170 175
att cac cat ggt gac ggc gtg gaa gag gcc ttc tac acc acg gac cgg	576	
Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg		
	180	185 190
gtc atg act gtg tcc ttt cat aag tat gga gag tac ttc cca gga act	624	40
Val Met Thr Val Ser Phe His Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr		
	195	200 205

ggg gac cta cgg gat atc ggg gct ggc aaa ggc aag tat tat gct gtt	672	
Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val		
210	215	220
aac tac ccg ctc cga gac ggg att gat gac gag tcc tat gag gcc att	720	
Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile		
225	230	235 240
ttc aag ccg gtc atg tcc aaa gta atg gag atg ttc cag cct agt gcg	768	10
Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala		
	245	250 255
gtg gtc tta cag tgt ggc tca gac tcc cta tct ggg gat cgg tta ggt	816	
Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly		
	260	265 270
tgc ttc aat cta act atc aaa gga cac gcc aag tgt gtg gaa ttt gtc	864	20
Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val		
	275	280 285
aag agc ttt aac ctg cct atg ctg atg ctg gga ggc ggt ggt tac acc	912	
Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr		
	290	295 300
att cgt aac gtt gcc cgg tgc agg aca tat gag aca gct gtg gcc ctg	960	30
Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu		
305	310	315 320
gat acg gag atc cct aat gag ctt cca tac aat gac tac ttt gaa tac	1008	
Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr		
	325	330 335
ttt gga cca gat ttc aag ctc cac atc agt cct tcc aat atg act aac	1056	40
Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn		
	340	345 350
cag aac acg aat gag tac ctg gag aag atc aaa cag cga ctg ttt gag	1104	

Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu		
355	360	365
aac ctt aga atg ctg ccg cac gca cct ggg gtc caa atg cag gcg att	1152	
Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile		
370	375	380
cct gag gac gcc atc cct gag gag agt ggc gat gag gac gaa gac gac	1200	
Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp		10
385	390	395
400		
cct gac aag cgc atc teg atc tgc tcc tct gac aaa ega att gcc tgt	1248	
Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys		
405	410	415
gag gaa gag ttc tcc gat tct gaa gag gag gga gag ggg ggc cgc aag	1296	
Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys		20
420	425	430
aac tct tcc aac ttc aaa aaa gcc aag aga gtc aaa aca gag gat gaa	1344	
Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu		
435	440	445
aaa gag aaa gac cca gag gag aag aaa gaa gtc acc gaa gag gag aaa	1392	
Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys		30
450	455	460
acc aag gag gag aag cca gaa gcc aaa ggg gtc aag gag gag gtc aag	1440	
Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys		
465	470	475
480		
ttg gcc tga	1449	
Leu Ala		40

<211> 482

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 12

10

Met	Ala	Gln	Thr	Gln	Gly	Thr	Arg	Arg	Lys	Val	Cys	Tyr	Tyr	Tyr	Asp
1				5					10					15	

Gly	Asp	Val	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gln	Gly	His	Pro	Met	Lys	Pro
			20					25					30		

His	Arg	Ile	Arg	Met	Thr	His	Asn	Leu	Leu	Leu	Asn	Tyr	Gly	Leu	Tyr
		35					40					45			

20

Arg	Lys	Met	Glu	Ile	Tyr	Arg	Pro	His	Lys	Ala	Asn	Ala	Glu	Glu	Met
	50					55					60				

Thr	Lys	Tyr	His	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ile	Lys	Phe	Leu	Arg	Ser	Ile	Arg
65					70					75				80	

30

Pro	Asp	Asn	Met	Ser	Glu	Tyr	Ser	Lys	Gln	Met	Gln	Arg	Phe	Asn	Val
				85					90					95	

Gly	Glu	Asp	Cys	Pro	Val	Phe	Asp	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Cys	Gln	Leu
			100					105					110		

40

Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln
 115 120 125

Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu Lys Leu Ala Lys Lys
 130 135 140

Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile
 145 150 155 160

10

Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp
 165 170 175

Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg
 180 185 190

20

Val Met Thr Val Ser Phe His Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr
 195 200 205

Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val
 210 215 220

30

Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile
 225 230 235 240

Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala
 245 250 255

40

Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly

260

265

270

Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val
 275 280 285

Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr
 290 295 300

10

Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu
 305 310 315 320

Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr
 325 330 335

20

Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn
 340 345 350

Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu
 355 360 365

30

Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile
 370 375 380

Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp
 385 390 395 400

40

Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys
 405 410 415

Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys
 420 425 430

Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu
 435 440 445

Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys
 450 455 460

10

Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys
 465 470 475 480

Leu Ala

20

<210> 13

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

30

<221> CDS

<222> (1).. (1449)

<223> Dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 13

atg gcg cag acg cag ggc acc cgg agg aaa gtc tgt tac tac tac gac 48

Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp 40

1

5

10

15

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

ctg gaa ctg cta aag tat cac cag agg gtg ctg tac att gac att gat	528	
Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp		
165	170	175
att cac cat ggt gac ggc gtg gaa gag gcc ttc tac acc acg gac egg	576	
Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg		
180	185	190
gtc atg act gtg tcc ttt ctt aag tat gga gag tac ttc cca gga act	624	10
Val Met Thr Val Ser Phe Leu Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr		
195	200	205
ggg gac cta cgg gat atc ggg gct ggc aaa ggc aag tat tat gct gtt	672	
Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val		
210	215	220
aac tac ccg ctc cga gac ggg att gat gac gag tcc tat gag gcc att	720	20
Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile		
225	230	235
ttc aag ccg gtc atg tcc aaa gta atg gag atg ttc cag cct agt gcg	768	
Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala		
245	250	255
gtg gtc tta cag tgt ggc tca gac tcc cta tct ggg gat cgg tta ggt	816	30
Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly		
260	265	270
tgc ttc aat cta act atc aaa gga cac gcc aag tgt gtg gaa ttt gtc	864	
Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val		
275	280	285
aag age ttt aac ctg cct atg ctg atg ctg gga ggc ggt ggt tac acc	912	40
Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr		
290	295	300
att cgt aac gtt gcc cgg tgc agg aca tat gag aca gct gtg gcc ctg	960	

Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu		
305	310	315 320
gat acg gag atc cct aat gag ctt cca tac aat gac tac ttt gaa tac		1008
Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr		
	325	330 335
ttt gga cca gat ttc aag ctc cac atc agt cct tcc aat atg act aac		1056
Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn		
	340	345 350
cag aac acg aat gag tac ctg gag aag atc aaa cag cga ctg ttt gag		1104
Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu		
	355	360 365
aac ctt aga atg ctg ccg cac gca cct ggg gtc caa atg cag gcg att		1152
Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile		
	370	375 380
cct gag gac gcc atc cct gag gag agt ggc gat gag gac gaa gac gac		1200
Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp		
385	390	395 400
cct gac aag cgc atc tcg atc tgc tcc tct gac aaa cga att gcc tgt		1248
Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys		
	405	410 415
gat gaa gag ttc tcc gat tct gaa gag gag gga gag ggg gcc cgc aag		1296
Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys		
	420	425 430
aac tct tcc aac ttc aaa aaa gcc aag aga gtc aaa aca gag gat gaa		1344
Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu		
	435	440 445
aaa gag aaa gac cca gag gag aag aaa gaa gtc acc gaa gag gag aaa		1392
Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys		

450	455	460	
acc aag gag gag aag cca gaa gcc aaa ggg gtc aag gag gag gtc aag			1440
Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys			
465	470	475	480
ttg gcc tga			1449
Leu Ala			
10			
<210> 14			
<211> 482			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1)			
gene			
<400> 14			
Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp			
1	5	10	15
Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro			
	20	25	30
His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr			
	35	40	45
Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met			
50	55	60	40

Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg
 65 70 75 80

Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val
 85 90 95

Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu
 100 105 110

10

Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln
 115 120 125

Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys
 130 135 140

20

Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile
 145 150 155 160

Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp
 165 170 175

30

Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg
 180 185 190

Val Met Thr Val Ser Phe Leu Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr
 195 200 205

40

Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val

210	215	220	
Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile			
225	230	235	240
Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala			10
	245	250	255
Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly			
	260	265	270
Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val			20
	275	280	285
Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr			
	290	295	300
Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu			30
305	310	315	320
Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr			
	325	330	335
Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn			40
	340	345	350
Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu			
	355	360	365

Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile
 370 375 380

Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp
 385 390 395 400

Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys
 405 410 415

10

Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys
 420 425 430

Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu
 435 440 445

20

Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys
 450 455 460

Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys
 465 470 475 480

30

Leu Ala

<210> 15

<211> 1287

<212> DNA

40

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1287)

<223> human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 15

atg gcc aag acc gtg gcc tat ttc tac gac ccc gac gtg ggc aac ttc	48	10
Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe		
1 5 10 15		
cac tac gga gct gga cac cct atg aag ccc cat cgc ctg gca ttg acc	96	
His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr		
20 25 30		
cat agc ctg gtc ctg cat tac ggt ctc tat aag aag atg atc gtc ttc	144	20
His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe		
35 40 45		
aag cca tac cag gcc tcc caa cat gac atg tgc cgc ttc cac tcc gag	192	
Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu		
50 55 60		
gac tac att gac ttc ctg cag aga gtc agc ccc acc aat atg caa ggc	240	30
Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly		
65 70 75 80		
ttc acc aag agt ctt aat gcc ttc aac gta ggc gat gac tgc cca gtg	288	
Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val		
85 90 95		
ttt ccc ggg ctc ttt gag ttc tgc tgc cgt tac aca ggc gca tct ctg	336	40
Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu		
100 105 110		
caa gga gca acc cag ctg aac aac aag atc tgt gat att gcc att aac	384	

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

260	265	270	
atc cga ggg cat ggg gaa tgc gtt gaa tat gtc aag agc ttc aat atc			864
Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile			
275	280	285	
cct cta ctc gtg ctg ggt ggt ggt ggt tat act gtc cga aat gtt gcc			912
Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala			
290	295	300	10
cgc tgc tgg aca tat gag aca tcg ctg ctg gta gaa gag gcc att agt			960
Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser			
305	310	315	320
gag gag ctt ccc tat agt gaa tac ttc gag tac ttt gcc cca gac ttc			1008
Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe			
325	330	335	20
aca ctt cat cca gat gtc agc acc cgc atc gag aat cag aac tca cgc			1056
Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg			
340	345	350	
cag tat ctg gac cag atc ctc cag aca atc ttt gaa aac ctg aag atg			1104
Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met			
355	360	365	30
ctg aac cat gca cct agt gtc cag att cat gac gtg cct gca gac etc			1152
Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu			
370	375	380	
ctg acc tat gac agg act gat gag get gat gca gag gag agg ggt cct			1200
Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro			
385	390	395	400
gag gag aac tat agc agg cca gag gca ccc aat gag ttc tat gat gga			1248
Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly			
405	410	415	

gac cat gac aat gac aag gaa agc gat gtg gag att taa 1287
 Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile
 420 425

<210> 16

<211> 428

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 16

Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe
 1 5 10 15

His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr
 20 25 30

20

His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe
 35 40 45

Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu
 50 55 60

30

Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly
 65 70 75 80

Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val
 85 90 95

40

Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu

100

105

110

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

Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe
 130 135 140

10

Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr
 145 150 155 160

His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly
 165 170 175

20

Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe
 180 185 190

His Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu
 195 200 205

30

Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg
 210 215 220

Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile
 225 230 235 240

40

Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys
 245 250 255

Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser
 260 265 270

Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile
 275 280 285

Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala
 290 295 300

10

Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser
 305 310 315 320

Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe
 325 330 335

20

Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg
 340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met
 355 360 365

30

Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu
 370 375 380

Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro
 385 390 395 400

40

Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly
 405 410 415

Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile
 420 425

<210> 17 10
 <211> 1287
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1287)
 <223> Dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 20
 (HDAC3) gene

<400> 17

atg gcc aag acc gtg gcc tat ttc tac gac ccc gac gtg ggc aac ttc 48
 Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe
 1 5 10 15

cac tac gga gct gga cac cct atg aag ccc cat cgc ctg gca ttg acc 96
 His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr 30
 20 25 30

cat agc ctg gtc ctg cat tac ggt ctc tat aag aag atg atc gtc ttc 144
 His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe
 35 40 45

aag cca tac cag gcc tcc caa cat gac atg tgc cgc ttc cac tcc gag 192
 Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu 40
 50 55 60

Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg		
210	215	220
gat ggc att gat gac cag agt tac aag cac ctt ttc cag ccg gtt atc		
Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile		720
225	230	235 240
aac cag gta gtg gac ttc tac caa ccc acg tgc att gtg ctc cag tgt		
Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys		768
	245	250 255
gga gct gac tet ctg ggc tgt gat cga ttg ggc tgc ttt aac ctc agc		
Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser		816
	260	265 270
atc cga ggg cat ggg gaa tgc gtt gaa tat gtc aag agc ttc aat atc		
Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile		864
	275	280 285
cct cta ctc gtg ctg ggt ggt ggt ggt tat act gtc cga aat gtt gcc		
Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala		912
	290	295 300
cgc tgc tgg aca tat gag aca tcg ctg ctg gta gaa gag gcc att agt		
Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser		960
305	310	315 320
gag gag ctt ccc tat agt gaa tac ttc gag tac ttt gcc cca gac ttc		
Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe		1008
	325	330 335
aca ctt cat cca gat gtc agc acc cgc atc gag aat cag aac tca cgc		
Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg		1056
	340	345 350
cag tat ctg gac cag atc ctc cag aca atc ttt gaa aac ctg aag atg		
Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met		1104

355	360	365	
ctg aac cat gca cct agt gtc cag att cat gac gtg cct gca gac ctc			1152
Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu			
370	375	380	
ctg acc tat gac agg act gat gag gct gat gca gag gag agg ggt cct			1200
Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro			
385	390	395	10
gag gag aac tat agc agg cca gag gca ccc aat gag ttc tat gat gga			1248
Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly			
405	410	415	
gac cat gac aat gac aag gaa agc gat gtg gag att taa			1287
Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile			
420	425		20
<210> 18			
<211> 428			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3			30
(HDAC3) gene			
<400> 18			
Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe			
1	5	10	15
His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr			40
20	25	30	

His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe
 35 40 45

Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu
 50 55 60

Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly
 65 70 75 80

10

Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val
 85 90 95

Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu
 100 105 110

20

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

Trp Ala Gly Gly Leu Lys Leu Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe
 130 135 140

30

Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr
 145 150 155 160

His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly
 165 170 175

40

Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe

180

185

190

His Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu
 195 200 205

Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg
 210 215 220

10

Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile
 225 230 235 240

Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys
 245 250 255

20

Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser
 260 265 270

Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile
 275 280 285

30

Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala
 290 295 300

Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser
 305 310 315 320

40

Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe
 325 330 335

Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg
 340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met
 355 360 365

Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu
 370 375 380

10

Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro
 385 390 395 400

Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly
 405 410 415

20

Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile
 420 425

<210> 19

<211> 1287

30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1287)

<223> Dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3)
 gene

40

<400> 19

atg gcc aag acc gtg gcc tat ttc tac gac ccc gac gtg ggc aac ttc 48
 Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe
 1 5 10 15

cac tac gga gct gga cac cct atg aag ccc cat cgc ctg gca ttg acc 96
 His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr
 20 25 30

cat agc ctg gtc ctg cat tac ggt etc tat aag aag atg atc gtc ttc 144
 His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe
 35 40 45

aag cca tac cag gcc tcc caa cat gac atg tgc cgc ttc cac tcc gag 192
 Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu
 50 55 60

gac tac att gac ttc ctg cag aga gtc agc ccc acc aat atg caa ggc 240
 Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly
 65 70 75 80

ttc acc aag agt ctt aat gcc ttc aac gta ggc gat gac tgc cca gtg 288
 Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val
 85 90 95

ttt ccc ggg etc ttt gag ttc tgc tgc cgt tac aca ggc gca tct ctg 336
 Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu
 100 105 110

caa gga gca acc cag ctg aac aac aag atc tgt gat att gcc att aac 384
 Gln Gly Ala Thr Gln Leu Asn Asn Lys Ile Cys Asp Ile Ala Ile Asn
 115 120 125

tgg gct ggt ggt ctg cac cat gcc aag aag ttt gag gcc tct ggc ttc 432
 Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe
 130 135 140

10

20

30

40

tgc tat gtc aac gac att gtg att ggc atc ctg gag ctg ctc aag tac	480	
Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr		
145	150	155
cac cct cgg gtg ctc tac att gac att gac atc cac cat ggt gac ggg	528	
His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly		
	165	170
gtt caa gaa gct ttc tac ctc act gac cgg gtc atg acg gtg tcc ttc	576	10
Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe		
	180	185
ctt aaa tac gga aat tac ttc ttc cct ggc aca ggt gac atg tat gaa	624	
Leu Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu		
	195	200
gtc ggg gca gag agt ggc cgc tac tac tgt ctg aac gtg ccc ctg cgg	672	20
Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg		
	210	215
gat ggc att gat gac cag agt tac aag cac ctt ttc cag ceg gtt atc	720	
Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile		
	225	230
aac cag gta gtg gac ttc tac caa ccc acg tgc att gtg ctc cag tgt	768	30
Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys		
	245	250
gga gct gac tct ctg ggc tgt gat cga ttg ggc tgc ttt aac ctc age	816	
Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser		
	260	265
atc cga ggg cat ggg gaa tgc gtt gaa tat gtc aag agc ttc aat atc	864	40
Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile		
	275	280
cct cta ctc gtg ctg ggt ggt ggt ggt tat act gtc cga aat gtt gcc	912	

<211> 428

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 20

10

Met	Ala	Lys	Thr	Val	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Asp	Pro	Asp	Val	Gly	Asn	Phe
1				5					10					15	

His	Tyr	Gly	Ala	Gly	His	Pro	Met	Lys	Pro	His	Arg	Leu	Ala	Leu	Thr
		20						25					30		

His	Ser	Leu	Val	Leu	His	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Lys	Lys	Met	Ile	Val	Phe
		35					40					45			

20

Lys	Pro	Tyr	Gln	Ala	Ser	Gln	His	Asp	Met	Cys	Arg	Phe	His	Ser	Glu
	50					55					60				

Asp	Tyr	Ile	Asp	Phe	Leu	Gln	Arg	Val	Ser	Pro	Thr	Asn	Met	Gln	Gly
65					70					75				80	

30

Phe	Thr	Lys	Ser	Leu	Asn	Ala	Phe	Asn	Val	Gly	Asp	Asp	Cys	Pro	Val
				85					90					95	

Phe	Pro	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Cys	Ser	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ala	Ser	Leu
			100					105					110		

40

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

Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe
 130 135 140

Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr
 145 150 155 160

10

His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly
 165 170 175

Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe
 180 185 190

20

Leu Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu
 195 200 205

Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg
 210 215 220

30

Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile
 225 230 235 240

Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys
 245 250 255

40

Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser

260

265

270

Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile
 275 280 285

Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala
 290 295 300

10

Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser
 305 310 315 320

Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe
 325 330 335

20

Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg
 340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met
 355 360 365

30

Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu
 370 375 380

Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro
 385 390 395 400

40

Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly
 405 410 415

Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile
 420 425

<210> 21

<211> 1458

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1458)

<223> human N-CoR (RD3) gene

<400> 21

gaa gtc ctt cag cct gct cca cat caa gtg ata act aat etc cct gaa 48
 Glu Val Leu Gln Pro Ala Pro His Gln Val Ile Thr Asn Leu Pro Glu 20
 1 5 10 15

ggc gtt cgg ctt ccg aca act cga cca acc agg cca ccg ccc cct etc 96
 Gly Val Arg Leu Pro Thr Thr Arg Pro Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu
 20 25 30

atc cgg tca tcc aaa acc aca gtg gct tca gaa aaa cca tct ttt ata 144
 Ile Pro Ser Ser Lys Thr Thr Val Ala Ser Glu Lys Pro Ser Phe Ile 30
 35 40 45

atg gga ggc tcc atc tca cag gga aca cca ggc act tat ttg act tet 192
 Met Gly Gly Ser Ile Ser Gln Gly Thr Pro Gly Thr Tyr Leu Thr Ser
 50 55 60

cat aat cag gct tcc tac act caa gaa aca ccc aag ccg tca gta gga 240
 His Asn Gln Ala Ser Tyr Thr Gln Glu Thr Pro Lys Pro Ser Val Gly 40
 65 70 75 80

tct atc tct ctt gga ctg cca cgg caa cag gaa tct gcc aaa tca got	288	
Ser Ile Ser Leu Gly Leu Pro Arg Gln Gln Glu Ser Ala Lys Ser Ala		
85 90 95		
act ttg ccc tac atc aag cag gaa gaa ttt tct ccc cga agc caa aac	336	
Thr Leu Pro Tyr Ile Lys Gln Glu Glu Phe Ser Pro Arg Ser Gln Asn		
100 105 110		
tca caa cct gag ggt ctg ttg gtc agg gcc caa cat gaa ggt gta gtc	384	10
Ser Gln Pro Glu Gly Leu Leu Val Arg Ala Gln His Glu Gly Val Val		
115 120 125		
aga ggt acc gca gga gcc ata caa gaa gga agt ata act cgg gga act	432	
Arg Gly Thr Ala Gly Ala Ile Gln Glu Gly Ser Ile Thr Arg Gly Thr		
130 135 140		
cca acc agc aaa att tca gtg gag agc att cca tcc cta cgg ggc tct	480	20
Pro Thr Ser Lys Ile Ser Val Glu Ser Ile Pro Ser Leu Arg Gly Ser		
145 150 155 160		
atc act cag ggc acc ccg get ctg ccc cag act ggc ata cca aca gag	528	
Ile Thr Gln Gly Thr Pro Ala Leu Pro Gln Thr Gly Ile Pro Thr Glu		
165 170 175		
get ttg gtg aag ggg tcc att teg aga atg ccc att gaa gac agc agt	576	30
Ala Leu Val Lys Gly Ser Ile Ser Arg Met Pro Ile Glu Asp Ser Ser		
180 185 190		
cct gag aaa ggc aga gag gaa gct gca tcc aaa ggc cat gtt att tat	624	
Pro Glu Lys Gly Arg Glu Glu Ala Ala Ser Lys Gly His Val Ile Tyr		
195 200 205		
gaa ggc aaa agt gga cat atc ttg tca tat gat aat att aag aat gcc	672	40
Glu Gly Lys Ser Gly His Ile Leu Ser Tyr Asp Asn Ile Lys Asn Ala		
210 215 220		
cga gaa ggg act agg agt cca aga aca gct cat gaa atc agt tta aag	720	

Arg Glu Gly Thr Arg Ser Pro Arg Thr Ala His Glu Ile Ser Leu Lys		
225	230	240
aga agc tat gaa tca gtg gaa gga aat ata aag caa ggg atg tca atg		768
Arg Ser Tyr Glu Ser Val Glu Gly Asn Ile Lys Gln Gly Met Ser Met		
	245	255
agg gag tct cct gta tca gca ccg tta gag ggg ctg ata tgc cga gca		816
Arg Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Glu Gly Leu Ile Cys Arg Ala		
	260	270
tta ccc agg ggg agt cct cat tct gac ctc aaa gaa agg act gta ttg		864
Leu Pro Arg Gly Ser Pro His Ser Asp Leu Lys Glu Arg Thr Val Leu		
	275	285
tct ggc tcc ata atg cag ggg aca cca aga gca aca act gaa agc ttt		912
Ser Gly Ser Ile Met Gln Gly Thr Pro Arg Ala Thr Thr Glu Ser Phe		
	290	300
gaa gat ggc ctt aaa tat ccc aaa caa att aaa agg gaa agt cct ccc		960
Glu Asp Gly Leu Lys Tyr Pro Lys Gln Ile Lys Arg Glu Ser Pro Pro		
305	310	320
ata cga gca ttt gaa ggt gcc att acc aaa gga aaa cca tat gat ggc		1008
Ile Arg Ala Phe Glu Gly Ala Ile Thr Lys Gly Lys Pro Tyr Asp Gly		
	325	335
atc acc acc atc aaa gaa atg ggg cgt tcc att cat gag att cca agg		1056
Ile Thr Thr Ile Lys Glu Met Gly Arg Ser Ile His Glu Ile Pro Arg		
	340	350
caa gat att tta act cag gaa agt cgg aaa act cca gaa gtg gtc cag		1104
Gln Asp Ile Leu Thr Gln Glu Ser Arg Lys Thr Pro Glu Val Val Gln		
	355	365
agc aca cgg ccg ata att gag ggt tcc att tcc cag ggc aca cca ata		1152
Ser Thr Arg Pro Ile Ile Glu Gly Ser Ile Ser Gln Gly Thr Pro Ile		

370

375

380

aag ttt gac aac aac tea ggt caa tct gcc atc aaa cac aat gtc aaa 1200
 Lys Phe Asp Asn Asn Ser Gly Gln Ser Ala Ile Lys His Asn Val Lys
 385 390 395 400

tcc tta atc acg ggg cct agc aaa cta tcc cgt gga atg cct ccg ctg 1248
 Ser Leu Ile Thr Gly Pro Ser Lys Leu Ser Arg Gly Met Pro Pro Leu
 405 410 415

10

gaa att gtg cca gag aac ata aaa gtg gta gaa cgg gga aaa tat gag 1296
 Glu Ile Val Pro Glu Asn Ile Lys Val Val Glu Arg Gly Lys Tyr Glu
 420 425 430

gat gtg aaa gca ggc gag acc gtg cgt tcc cgg cac acg tca gtg gta 1344
 Asp Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Arg Ser Arg His Thr Ser Val Val
 435 440 445

20

age tct ggc ccc tcc gtt ctt agg tcc aca ctg cat gaa gct ccc aaa 1392
 Ser Ser Gly Pro Ser Val Leu Arg Ser Thr Leu His Glu Ala Pro Lys
 450 455 460

gca caa ctg agc cct ggg att tat gat gac acc agt gca cgg agg acc 1440
 Ala Gln Leu Ser Pro Gly Ile Tyr Asp Asp Thr Ser Ala Arg Arg Thr
 465 470 475 480

30

cct gtg agt tat caa aac 1458
 Pro Val Ser Tyr Gln Asn
 485

<210> 22

<211> 486

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

40

Glu Val Leu Gln Pro Ala Pro His Gln Val Ile Thr Asn Leu Pro Glu
 1 5 10 15

Gly Val Arg Leu Pro Thr Thr Arg Pro Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu
 20 25 30

Ile Pro Ser Ser Lys Thr Thr Val Ala Ser Glu Lys Pro Ser Phe Ile
 35 40 45

10

Met Gly Gly Ser Ile Ser Gln Gly Thr Pro Gly Thr Tyr Leu Thr Ser
 50 55 60

His Asn Gln Ala Ser Tyr Thr Gln Glu Thr Pro Lys Pro Ser Val Gly
 65 70 75 80

20

Ser Ile Ser Leu Gly Leu Pro Arg Gln Gln Glu Ser Ala Lys Ser Ala
 85 90 95

Thr Leu Pro Tyr Ile Lys Gln Glu Glu Phe Ser Pro Arg Ser Gln Asn
 100 105 110

30

Ser Gln Pro Glu Gly Leu Leu Val Arg Ala Gln His Glu Gly Val Val
 115 120 125

Arg Gly Thr Ala Gly Ala Ile Gln Glu Gly Ser Ile Thr Arg Gly Thr
 130 135 140

40

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

145

150

155

160

Ile Thr Gln Gly Thr Pro Ala Leu Pro Gln Thr Gly Ile Pro Thr Glu
 165 170 175

Ala Leu Val Lys Gly Ser Ile Ser Arg Met Pro Ile Glu Asp Ser Ser
 180 185 190

10

Pro Glu Lys Gly Arg Glu Glu Ala Ala Ser Lys Gly His Val Ile Tyr
 195 200 205

Glu Gly Lys Ser Gly His Ile Leu Ser Tyr Asp Asn Ile Lys Asn Ala
 210 215 220

20

Arg Glu Gly Thr Arg Ser Pro Arg Thr Ala His Glu Ile Ser Leu Lys
 225 230 235 240

Arg Ser Tyr Glu Ser Val Glu Gly Asn Ile Lys Gln Gly Met Ser Met
 245 250 255

30

Arg Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Glu Gly Leu Ile Cys Arg Ala
 260 265 270

Leu Pro Arg Gly Ser Pro His Ser Asp Leu Lys Glu Arg Thr Val Leu
 275 280 285

40

Ser Gly Ser Ile Met Gln Gly Thr Pro Arg Ala Thr Thr Glu Ser Phe
 290 295 300

Glu Asp Gly Leu Lys Tyr Pro Lys Gln Ile Lys Arg Glu Ser Pro Pro
 305 310 315 320

Ile Arg Ala Phe Glu Gly Ala Ile Thr Lys Gly Lys Pro Tyr Asp Gly
 325 330 335

Ile Thr Thr Ile Lys Glu Met Gly Arg Ser Ile His Glu Ile Pro Arg
 340 345 350

10

Gln Asp Ile Leu Thr Gln Glu Ser Arg Lys Thr Pro Glu Val Val Gln
 355 360 365

Ser Thr Arg Pro Ile Ile Glu Gly Ser Ile Ser Gln Gly Thr Pro Ile
 370 375 380

20

Lys Phe Asp Asn Asn Ser Gly Gln Ser Ala Ile Lys His Asn Val Lys
 385 390 395 400

Ser Leu Ile Thr Gly Pro Ser Lys Leu Ser Arg Gly Met Pro Pro Leu
 405 410 415

30

Glu Ile Val Pro Glu Asn Ile Lys Val Val Glu Arg Gly Lys Tyr Glu
 420 425 430

Asp Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Arg Ser Arg His Thr Ser Val Val
 435 440 445

40

Ser Ser Gly Pro Ser Val Leu Arg Ser Thr Leu His Glu Ala Pro Lys
 450 455 460

Ala Gln Leu Ser Pro Gly Ile Tyr Asp Asp Thr Ser Ala Arg Arg Thr
 465 470 475 480

Pro Val Ser Tyr Gln Asn
 485

10

<210> 23

<211> 731

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(731)

<223> 5'-flanking region of Human interleukin-2 (IL-2) gene

20

<400> 23

ctgagtattt aacaatcgca ccctttaaaa aatgtacaat agacattaag agacttaaac 60

agatatataa tcattttaaa ttaaatagc gttaaacagt acctcaagct caataagcat 120

tttaagtatt ctaatcttag tatttcteta gctgacatgt aagaagcaat ctatcttatt 180

gtatgcaatt agctcattgt gtggataaaa aggtaaaacc attctgaaac aggaaaccaa 240

tacacttctt gttaatcaa caaatctaaa catttattct tttcatctgt ttactcttgc 300

tcttgccac cacaatatgc tattcacatg ttcagtgtag ttttaggaca aagaaaattt 360

tctgagttac ttttgatccc ccacccctt aaagaaagga ggaaaaactg tttcatacag 420

30

40

aaggcgttaa ttgcatgaat tagagctatc acctaagtgt gggctaattgt aacaaagagg 480
 gatttcacct acatccattc agtcagtctt tgggggttta aagaaattec aaagagtcat 540
 cagaagagga aaaatgaagg taatgttttt tcagacaggt aaagtctttg aaaatatgtg 600
 taatatgtaa aacattttga caccccata atatttttcc agaattaaca gtataaattg 660
 catctcttgt tcaagagttc cctatcactc tctttaatca ctactcacag taacctcaac 720 10
 tectgccaca a 731

<210> 24

<211> 527

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (73)..(506)

<223> 5'-flanking region of Human interleukin-2 (IL-2) gene

<400> 24

gggnnnnng gngatectct accactatag ggcgaattga atttagcggc cgcgantteg 60 30
 ceettcgeta gctgctcttg tccaccacaa tatgctatc acatgttcag thtagtttta 120
 ggacaaagaa aattttctga gttacttttg tatecccacc ccettaaaga aaggaggaaa 180
 aactgtttca tacagaaggc gttaattgca tgaattagag ctatcaccta agtgtgggct 240
 aatgtaacaa agagggattt cacctacatc cattcagtca gtctttgggg gtttaaagaa 300
 attccaaaga gtcacagaa gaggaaaaat gaaggtaatg tttttcaga caggtaaagt 360 40
 cttgaaaat atgtgtaata tgtaaacat ttgacaccc ccataatatt tttccagaat 420

taacagtata aattgcatct ctgttcaag agtccctat cactctcttt aatcactact 480

cacagtaacc tcaactcctg ccacaagctt cgaaggcga attcgtt 527

<210> 25

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (57)..(875)

<223> Promoter region of Human GATA-1 gene

<400> 25

tgcctcttta ctatagggeg aattgaattt agcgcccgcg aattegccct tgatctatcc 60

20

ctggctccca cctcagtttc ccgctccaa ggcagcatgg cgggcaagaa gttgaggcca 120

ctgtccctgg gtgttcctac cccacaccc tcaacccaag acagcctggt actgcggcgc 180

caacagccac ggtgcctac atctgataag acttatctgc tgccccaggg caggccggag 240

ctggcgtaag cccagtggg gcgctaagt agtgtgccc tgctcccgc cagcactggc 300

30

ctggcctgca ggcttagcct gggctatcaa ggtatcccac aggcctctagt tcaaatccag 360

cagaacctct ctgagcctca ctcttctcac ctgcaaaatg ggtacagcca catccttct 420

ctccctgcag ccaggaagac gcacatacac aggagtctag cccacaccgg ccccgcaaa 480

attaagggct ttactctctg aaaagcccag tgaagtcatg aaaccatata tgcatttttc 540

40

atztatcttg gtttcagcct attttgcttg tetggacaact acagtcacag ggagcctagg 600

tcgagcgagg tccaagaatc cccagggtgg gcagggaggg tggaagaggg cctccagtgc 660
ccaagagtg cccacaagc atgggacctg cccctcccc tggactgccc caccactgg 720
ggcaccagcc actccctggg gaggaggag gagggagaag ggaggaggg agggaggag 780
gaaggagcc tcaaaggcca aggccagcca ggacaccccc tgggatcaca ctgagcttgc 840
cacatcccca aggcggcca accctccgca accaccaaag cttataagg cgaattcgtt 900

10

<210> 26
<211> 660
<212> DNA
<213> Homo sapiens

20

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(647)
<223> Promoter region of Human GATA-1 gene

<400> 26
ttatgtacc acccagaag atgccaggag ggagtgagcc agtcaggga ggcttccgag 60
aagagaggac attgaagaag agtctcaaac ttaggcctga cggagaagac gcgcggccag 120
gacacccac cccgcctc gtctcccca aagcctgate tggeccact gattccctta 180
tctgcccact ccagctgcc tcttgctgg ctgaactgtc gcgcagact tctgagcctg 240
cgccccctcc acgggatgg gggaggaat ggggtgagc ctggcctcac agcctcgggg 300
ttccagctc ttgctggagg cagggetctg ggcgcctta ctctcacc ttggttctc 360
ttctgagcg ctctgtgctc tcagaaatg aagaaatgg gtgagtccag cggccaaacc 420

30

40

cttgtcttag ctcttagaca tgcctegage ctgccattcc ctgtgaggac agatttcct 480
 atgttgogac cgctgcttct aataataata atgatgatga taattccat ttacagagca 540
 caccatttat ggtgtgccag caggccctgt gctgagtggc tctaccac gtggggggct 600
 aggactttac ccgttttcca gatgaagaaa ctgaggctca gagggcgcta gcataagggc 660

10

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying the 5'-flanking region of Human interleukin-2
 (IL-2) gene

20

<400> 27

tcgctagcct gagtatttaa caatgcacc ct 32

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> PCR primer for amplifying the 5'-flanking region of Human interleukin-2
 (IL-2) gene

<400> 28

cgaagcttgt ggcaggagtt gaggttactg 30

40

<210> 29

<211> 777

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(777)

<223> Corresponding to the sequence (+661 to +1437) in the GenBank database
(Accession: HSIL05)

10

<400> 29

atcagtatcc ttgaatcgaa acctttttct gagtatttaa caatcgcacc ctttaaaaaa 60

tgtacataga cattaagaga cttaaacaga tatataatca ttttaaatta aaatagcgtt 120

aaacagtacc tcaagctcaa taagcatttt aagtatteta atcttagtat ttctctagct 180

gacatgtaag aagcaateta tcttattgta tgcaattage tctttgtgtg gataaaaagg 240

20

taaaaccatt ctgaaacagg aaaccaatac acttctgtt taatcaacaa atctaaacat 300

ttattctttt catctgttta ctcttgctct tgccaccac aatatgctat tcacatgttc 360

agtgtagttt tatgacaaag aaaattttct gagtacttt tgtatcccca ccccttaaa 420

gaaaggagga aaaactgttt caticagaag gcgttaattg catgaattag agctatcacc 480

30

taagtgtggg ctaatgtaac aaagagggat ttcacctaca tccattcagt cagtctttgg 540

gggtttaaag aaattccaaa gagtcatcag aagaggaaaa atgaaggtaa tgttttttca 600

gactggtaaa gtctttgaaa atatgtgtaa tatgtaaac attttgacac ccccataata 660

ttttccaga attaacagta taaattgcat ctcttggtca agagtccct atcactcttt 720

40

aatcactact cacagtaacc tcaactctg ccacaatgta caggatgcaa ctctctgt 777

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying the 5'-flanking region of Human interleukin-2 (IL-2) gene

10

<400> 30

cgctagctgc tcttgtccac cacaatatgc

30

<210> 31

<211> 538

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(538)

<223> Corresponding to the sequence (+901 to +1438) in the GenBank database (Accession: HSIL05)

<400> 31

taaaaccatt ctgaaacagg aaaccaatac acttoctggt taatcaacaa atctaaacat

60

30

ttattctttt catctgttta ctettgctct tgtccaccac aatattgctat teacatgttc

120

agtgtagttt tatgacaaag aaaattttct gagttacttt tgtatcecca ccccttaaa

180

gaaaggagga aaaactgttt catacagaag gogttaattg catgaattag agctatcacc

240

taagtgtggg ctaatgtaac aaagagggat ttcacctaca tccattcagt cagtctttgg

300

40

gggtttaaag aaattccaaa gagtcatcag aagaggaaaa atgaaggtaa tgttttttca

360

gactggtaaa gtotttgaaa atatgtgtaa tatgtaaaac attttgacac cccataata 420

ttttccaga attaacagta taaattgeat ctottgttca agagttccct atcaactttt 480

aatcaactact cacagtaace tcaactcctg ccacaatgta caggatgcaa ctectgtc 538

<210> 32

<211> 28

10

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying the promoter region of Human GATA-1 gene

<400> 32

atagatctat ccctggctcc cacctcag 28

20

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying the promoter region of Human GATA-1 gene

30

<400> 33

ataagctttg gtggttgagg agggttcg 28

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

40

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying the promoter region of Human GATA-1 gene

<400> 34

atggtaccac cccagaagat gccaggag 28

<210> 35

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> PCR primer for amplifying the promoter region of Human GATA-1 gene

<400> 35

atgctagcgc cctctgagcc tcagtttc 28

20

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 36

gaggaattca agatggcgca gac 23

30

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 37
ggagcggccg ctteaggcca acttg 25

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial 10

<220>
<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-2 (HDAC2) gene

<400> 38
ggggateccat gggttacagt caag 24

<210> 39 20
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-2 (HDAC2) gene

<400> 39 30
ggtgcggccg ccaaattcag gggttgctg 29

<210> 40
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220> 40
<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 40

ccggatccac catggccaag ac

22

<210> 41

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 41

gcagcgccg ccactcttaa atctccac

28

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

20

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 42

gggaattcat gagctcccaa agccatcc

28

30

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

40

<400> 43

aagcgcgcgc agcttcgagg gagtgctac

29

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-5 (HDAC5) gene

10

<400> 44

ggcaagetta tgaactctcc caacgag

27

<210> 45

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

20

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-5 (HDAC5) gene

<400> 45

gggcggcgc gtcacagggc aggctctg

29

30

<210> 46

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-6 (HDAC6) gene

40

<400> 46

gCGAAGCTTA TGACCTCAAC CGGCCAG

27

<210> 47

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-6 (HDAC6) gene

10

<400> 47

gCATGGGCC GCTTAGTGTG GGTGGGGCAT ATC

33

<210> 48

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

20

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-7 (HDAC7) gene

<400> 48

CGAATTCAGC CGCAGCCCAT GGACCT

26

30

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-7 (HDAC7) gene

40

<400> 49

CGGTACCCTG TGCACCCGGA TCACGG

26

<210> 50
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-8 (HDAC8) gene

<400> 50 10
cgaattcttt aagcggaaga tggagg 26

<210> 51
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial 20

<220>
<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-8 (HDAC8) gene

<400> 51
aggtaccgac cacatgcttc agatte 26

<210> 52
<211> 24 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 52
ctgaattcac catggccaag accg 24 40

<210> 53

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for adding a Flag sequence to a human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

10

<400> 53

ggggggccgc ctacttgta tegtgtctct tgtaatcggg accaatctec acatcgcttt 60

c 61

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Flag sequence

<400> 54

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

30

<210> 55

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for adding a Kpn I site to a human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

40

<400> 55		
atcggtagcg gccaaattga cctcctctctt g	31	
<210> 56		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial		10
<220>		
<223> PCR primer for adding a Kpn I site to a human histone deacetylase-2 (HDAC2) gene		
<400> 56		
atcggtagcg gggttgctga gctggtctg	29	
<210> 57		20
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> PCR primer for adding a Bgl II site to a human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene		30
<400> 57		
gatagatctc aggggcggct cctcttc	27	
<210> 58		
<211> 46		
<212> DNA		
<213> Artificial		40
<220>		

<223> Nucleotide sequence having a Flag nucleotide sequence

<400> 58

aattcctgca gagatctgat tacaaggacg acgatgacaa gtagge

46

<210> 59

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Nucleotide sequence having a Flag nucleotide sequence

<400> 59

ggcgcctac ttgtcatcgt cgctcctgta atcagatetc tgcagg

46

20

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

30

<400> 60

cagtgacacc atatggaacg agg

23

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 61

gcaagctttc caggggggcg

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 62

ccccctggaa agcttgcgga

20

20

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 63

gacatgtaca ggacgctagg gt

22

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H863L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 64

cctgtacatg tccctccttc g

21

<210> 65

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H863L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

20

<400> 65

atagatctag acaggggegg

20

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 66

gaggaattca agatggcgca gac

23

<210> 67

40

<211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 67
 ctgggacttc ttgcaagct tcagg 25 10

<210> 68
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220> 20
 <223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 68
 gggcctgaag cttgcaaaga agtc 24

<210> 69
 <211> 25 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 69 40
 gtgaatatca atgtcaatgt acagc 25

- <210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene 10
- <400> 70
gacggcgtgg aagaggcctt c 21
- <210> 71
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial 20
- <220>
<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene
- <400> 71
gaagtactct ccatacttaa gaaagg 26
- 30
- <210> 72
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene 40
- <400> 72
ctgtgtcctt tettaagtat ggagag 26

- <210> 73
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene 10
- <400> 73
tctcggagcg ggtagttaac ag 22
- <210> 74
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial 20
- <220>
<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene
- <400> 74
aaccagctg aacaacaaga tctg 23
- <210> 75
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene 40

- <400> 75
ctcaaacttc ttggcaagct tcagac 26
- <210> 76
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial 10
- <220>
<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene
- <400> 76
tgggtggtctg aagcttgcca agaag 25
- <210> 77 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene 30
- <400> 77
cccgtcacca tggatgatgt c 21
- <210> 78
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial 40
- <220>
<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H193L) of human

histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 78

tgacattgac atccacatg gtg

23

<210> 79

<211> 26

<212> DNA

10

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 79

gaagtaattt ccgtacttaa ggaagg

26

20

<210> 80

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

30

<400> 80

tgtccttct taagtaogga aattac

26

<210> 81

<211> 22

<212> DNA

40

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 81

gagcacaatg cacgtgggtt gg 22

<210> 82

10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying RD3 sequence of human N-CoR gene

<400> 82

20

gggatccgtg aagtccttca gcctgctcc 29

<210> 83

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

30

<223> PCR primer for amplifying RD3 sequence of human N-CoR gene

<400> 83

tgcggcgcgc atgggtgagc ctctggaca 29

<210> 84

<211> 960

40

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (960)

<223> Corresponding to the sequence (+5281 to +6240) in the GenBank database
(Accession: AF196971)

<400> 84

gcctctgtct ctcccactcc acccctttcc tttcctacc tatcccactc ctcgaggaat 60

catcctggc tcccacctca gtttcccgcc tccaaggcag catggcgggc aagaagtga 120

ggccactgtc cctgggtgtt cctaccccca caccctcacc ccaagacagc ctgttactgc 180

ggcgccaaca gccacggtcg cctacatctg ataagactta tctgtgccc cagggcaggc 240

cggagctggc gtaagcccca gtggggcgct aagtgagtgt gccctgcct cccgccagca 300

ctggcctggc ctgcaggctt agcctgggtc atcaaggat cccacaggct ctagtccaaa 360

tccagcagaa cctctctgag cctcactctt ctcaactgca aaatgggtac agccacatcc 420

cttctctccc tgcagccagg aagacgcaca tacacaggag tctagccac accggccccc 480

cacaaattaa gggtttact ctctgaaaag cccagtgaag tcatgaaacc atatctgcta 540

ttttcattta tcttggttcc agcctatctt gcttgtctgg aactacagt ccacggggagc 600

ctaggtcgag cgaggtccaa gaatccccag ggtgggcagg gaggtggaa gagggcctcc 660

agtgcccag aggtgcccc caagcatggg acccgcccc tcccctggac tgecccacc 720

actggggcac cagccactcc ctggggagga gggaggagg agaaggagg gagggagga 780

gggaggaagg gagcctcaaa ggccaaggcc agccaggaca cccctggga tcacactgag 840

cttgccacat cccaaggcg gccgaacct cgcgaaccac cageccaggt cagtctcagc 900

10

20

30

40

ccccagagag cccccaccaa ggcaaccctg ggccctgctgc ccctaccctt atgettgtc 960

<210> 85

<211> 720

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (1)..(720)

<223> Corresponding to the sequence (+2321 to +3040) in the GenBank database
(Accession: AF196971)

<400> 85

gtacaaatgc catggggcct ggaccaagca ggggctctag aaccccagaa gatgccagga 60

gggagtgagc cagtcaggga aggcttccga gaagagagga cattgaagaa gagtctcaaa 120

20

cttaggcctg acggagaaga cgcggggcca ggacacocca cccccgcct cgtctcccc 180

aaagcctgat ctggccccac tgattccctt atctgcccac tcccagctgc ctcttctgtg 240

gctgaactgt cgccgcagac ttctgagcct gogccccctc cacggggatg ggggagggaa 300

tggggtgagg cctggcctca cagcctcggg gtttccagct cttgctggag gcagggtct 360

30

ggggcgcctt actctcacc cttggcttct ctctctgagc gctctgtgtct ctccagaaat 420

gaagaaatgg ggtgagtcca gggccaaac ccttgtctta getcttagac atgcctcgag 480

cctgccattc cctgtgagga cagatttccc tatgttgoga ccgctgcttc taataataat 540

aatgatgatg ataattceca ttacagagc acaccattta tgggtgtcca gcaggccctg 600

40

tgtgagtgg ttctacceca cgtggggggc taggaattta cccgttttcc agatgaagaa 660

actgaggctc agaggcgctc tggcccagga atcacacagc aatcacaca gcaaatcaga 720

- <210> 86
- <211> 12
- <212> DNA
- <213> homo sapiens

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(12)
- <223> Palindrome sequence founed on the 3' side of the GATA-E-box motif in promoter region of human GATA-1 gene

<400> 86
ctgtggccac ag

12

10

【 図 1 】

図 1

```

661' ATCAGTATCCTGGAATCGAAACCTTTTCTGAGTATTAAACAATCGCACCCCTTAAAAAA
1' *****
CTGAGTATTTAAACAATCGCACCCCTTAAAAAA
721' TGTAC-ATAGACATTAAGAGACTTAAACAGATATATAATCAATTTAAATAAAAATAGCGT
*** *****
33' TGTACAATAGACATTAAGAGACTTAAACAGATATATAATCAATTTAAATAAAAATAGCGT
780' TAAACAGTACCTCAAGCTCAATAAGCATTTAAGTATTCTAATCTTAGTATTTCTCTAGC
*****
93' TAAACAGTACCTCAAGCTCAATAAGCATTTAAGTATTCTAATCTTAGTATTTCTCTAGC
840' TGACATGTAAGAAGCAATCTATCTTATGTAATGCAATAGCTCTTTGTTGGATAAAAAG
*****
153' TGACATGTAAGAAGCAATCTATCTTATGTAATGCAATAGCTCTTTGTTGGATAAAAAG
900' GTAAACCATTTCTGAAACAGGAAACCAATACACTCTGTTAATCAACAATCTAAACA
*****
213' GTAAACCATTTCTGAAACAGGAAACCAATACACTCTGTTAATCAACAATCTAAACA
960' TTTATCTTTTCATCTGTTTACTCTGCTCTGTCACCACAATATGCTATTGACATGTT
*****
273' TTTATCTTTTCATCTGTTTACTCTGCTCTGTCACCACAATATGCTATTGACATGTT
1020' CAGTGTAGTTTATGACAAAAGAAAATTTCTGAGTACTTTGTAATGCCAACCOCCTTAA
*****
333' CAGTGTAGTTTATGACAAAAGAAAATTTCTGAGTACTTTGTAATGCCAACCOCCTTAA
1080' AGAAGGAGGAAAAAAGCTGTTGATACAGAGGCGTAAATGCAATGATAGAGCTATCAC
*****
393' AGAAGGAGGAAAAAAGCTGTTGATACAGAGGCGTAAATGCAATGATAGAGCTATCAC
1140' CTAAGTGTGGGCTAATGTAACAAGAGGGATTCACCTACATCCATTGACGCTCTTTG
*****
453' CTAAGTGTGGGCTAATGTAACAAGAGGGATTCACCTACATCCATTGACGCTCTTTG
1200' GGGGTTTAAAGAAATCCAAAGAGTCATCAGAAGGAAAAATGAAGTAATGTTTTTC
*****
513' GGGGTTTAAAGAAATCCAAAGAGTCATCAGAAGGAAAAATGAAGTAATGTTTTTC
1260' AGACTGTGTAAGTCTTTGAAAATATGTTAATGTAATAATTTGACACCCCCATAAT
*** *****
573' AGACAGGTAAGTCTTTGAAAATATGTTAATGTAATAATTTGACACCCCCATAAT
1320' ATTTTCCAGAAATTAACAGTATAAATGCAATCTCTGTTCAAGAGTTCOCCTATCA-CTC
*****
633' ATTTTCCAGAAATTAACAGTATAAATGCAATCTCTGTTCAAGAGTTCOCCTATCACTCTC
1378' TTTAATCACTACTCACAGTAACTCACTCCCTGCCAAGTACAGGATGCAACTCCTCTGT
*****
693' TTTAATCACTACTCACAGTAACTCACTCCCTGCCAAGTACAGGATGCAACTCCTCTGT

```

【 図 2 】

図 2

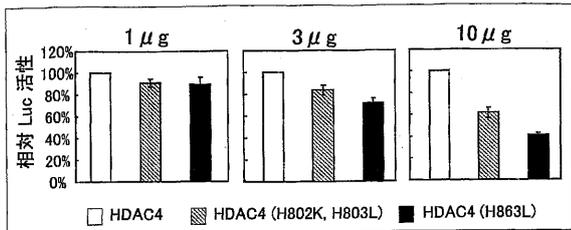
```

901' TAAAACCATCTGAAACAGGAAACCAATACACTCTCCTGTTTAAATCAACAATCTAAGCAT
1' GGGNNNNNGNGATCCTCTACCACTATAGGGCAATGAATTAGCG
961' TTATTCTTTTCATCTGTTTACTCTGCTCTGTCACCACAATATGCTATTGACATGTT
*****
49' GCCCGGANTGCGCCTCGCTAGCTGCTCTGTCACCACAATATGCTATTGACATGTT
1021' ACTGTAGTTTATGACAAAAGAAAATTTCTGAGTACTTTGTAATGCCAACCOCCTTAA
*****
109' AGTGTAGTTTATGACAAAAGAAAATTTCTGAGTACTTTGTAATGCCAACCOCCTTAA
1081' GAAAGGAGGAAAAAGCTGTTTCAAGAGGCGTAAATGCAATGATAGAGCTATCAC
*****
169' GAAAGGAGGAAAAAGCTGTTTCAAGAGGCGTAAATGCAATGATAGAGCTATCAC
1141' TAAGTGTGGGCTAATGTAACAAGAGGGATTCACCTACATCCATTGACGCTCTTTG
*****
229' TAAGTGTGGGCTAATGTAACAAGAGGGATTCACCTACATCCATTGACGCTCTTTG
1201' GGGTTTAAAGAAATCCAAAGAGTCATCAGAAGGAAAAATGAAGTAATGTTTTTC
*****
289' GGGTTTAAAGAAATCCAAAGAGTCATCAGAAGGAAAAATGAAGTAATGTTTTTC
1261' GACTGTGTAAGTCTTTGAAAATATGTTAATGTAATAATTTGACACCCCCATAATA
** *****
349' GACAGGTAAGTCTTTGAAAATATGTTAATGTAATAATTTGACACCCCCATAATA
1321' TTTTCCAGAAATTAACAGTATAAATGCAATCTCTGTTCAAGAGTTCOCCTATCA-CTC
*****
409' TTTTCCAGAAATTAACAGTATAAATGCAATCTCTGTTCAAGAGTTCOCCTATCACTCT
1379' TTAATCACTACTCACAGTAACTCACTCCCTGCCAAGTACAGGATGCAACTCCTCTGT
*****
469' TTAATCACTACTCACAGTAACTCACTCCCTGCCAAGTACAGGATGCAACTCCTCTGT

```

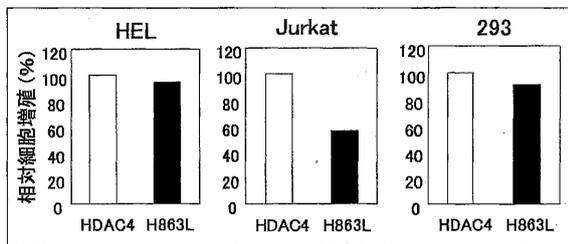

【 図 8 】

図 8



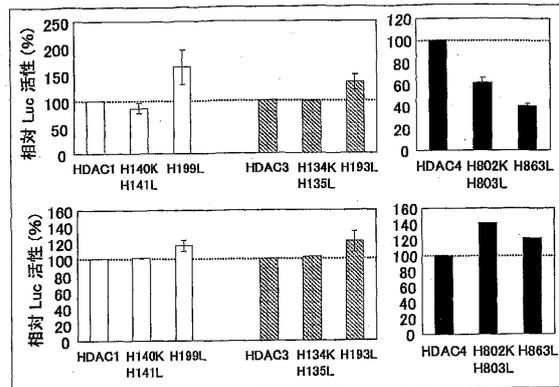
【 図 9 】

図 9



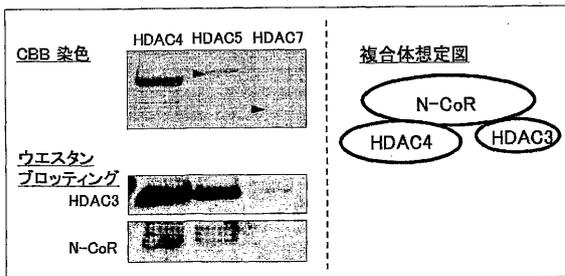
【 図 10 】

図 10



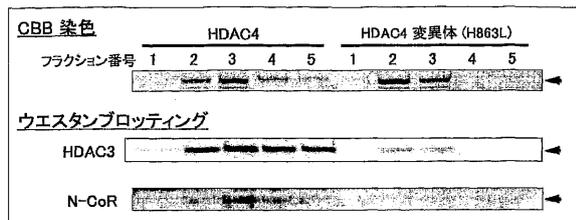
【 図 11 】

図 11



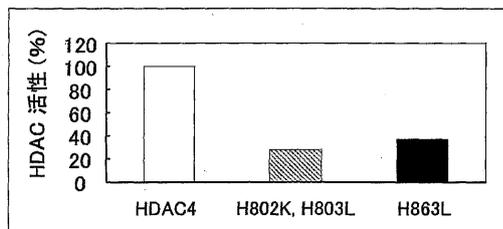
【 図 12 】

図 12



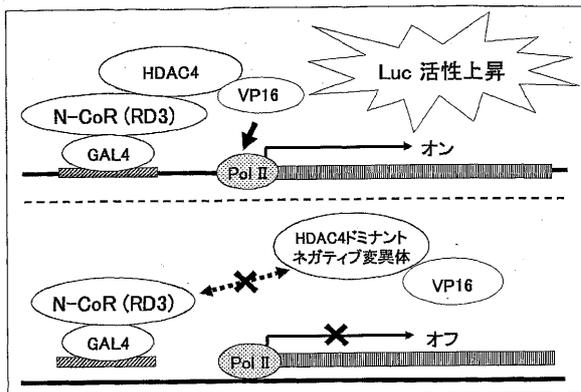
【 図 13 】

図 13



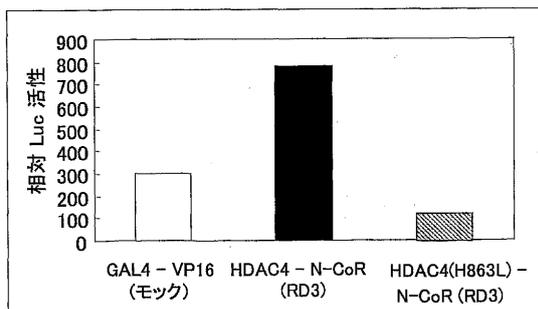
【 図 14 】

図 14



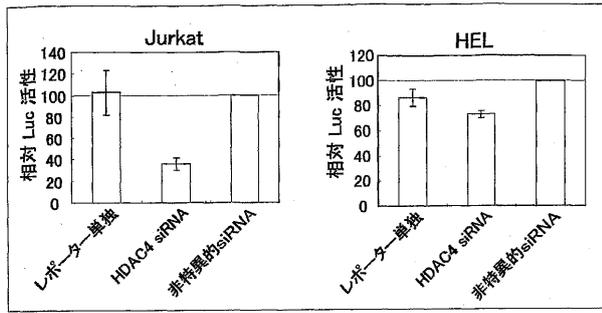
【 図 15 】

図 15



【图 16】

图 16



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP03/16895
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/09, 9/14, C12Q1/34, 1/68, 1/02, A61K45/00, A61P37/06, 43/00		
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 ⁷ C12N15/00-90, 9/00-9/99, C12Q1/00-70, A61K45/00, A61P37/06, 43/00		
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) JICST FILE (JIOS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	C.A. HASSING et al., A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression., Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 1998, 95, p.3519-24	14, 15
Y	A.H. WANG et al., HDAC4, a Human Histone Deacetylase Related to Yeast HDA1, Is a Transcriptional Corepressor., Molecular and Cellular Biology, 1999, p.7816-27	14, 15
E, A	WO 04/007758 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 January, 2004 (22.01.04), (Family: none)	1-19
<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:	"I" 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	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"&" document member of the same patent family	
"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		
Date of the actual completion of the international search 24 February, 2004 (24.02.04)	Date of mailing of the international search report 09 March, 2004 (09.03.04)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP03/16895

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	W. FISCHLE et al., Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Mutiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT/N-CoR., Molecular Cell, 09 January, 2002 (09.01.02), pages 45 to 57	1-19
A	WO 00/08048 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 February, 2000 (17.02.00), (Family: none)	1-19
A	R.A. SHIVDASANI et al., A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in magakaryocyte growth and platelet development., EMBO J., 1997, 16(3), p.3965-73	1-19
A	I. TAKAHASHI et al., Selective Inhibition of IL-2 Gene Expression by Trichostatin A, a Potent Inhibitor of mammalian Histone Deacetylase., The Journal of Antibiotics, 1996, 49(5), p.453-7	1-19

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/16895	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ¹ C12N15/09, 9/14, C12Q1/34, 1/68, 1/02, A61K 45/00, A61P 37/06, 43/00			
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 ¹ C12N15/00-90, 9/00-9/99, C12Q1/00-70, A61K 45/00, A61P 37/06, 43/00			
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)			
JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)			
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	
Y	C. A. HASSIG, et al., A role for histone deacetylase activity in HDACi-mediated transcriptional repression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, p. 3519-24	14, 15	
Y	A. H. WANG, et al., HDAC4, a Human Histone Deacetylase Related to Yeast HDAC1, Is a Transcriptional Corepressor. Molecular and Cellular Biology, 1999, p. 7816-27	14, 15	
EA	WO 04/007758 A1 (藤沢薬品工業株式会社) 2004. 01. 22 (ファミリーなし)	1-19	
<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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 24. 02. 2004		国際調査報告の発送日 09. 3. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JJP) 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) 阪野 誠司	4B 9286
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/16895
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	W. FISCHLE, et al., Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Multiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. Molecular Cell, January 2002, 9, p.45-57	1-19
A	WO 00/08048 A1 (藤沢薬品工業株式会社) 2000.02.17 (ファミリーなし)	1-19
A	R. A. SHIVDASANI, et al., A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. EMBO J., 1997, 16 (13), p.3965-73	1-19
A	I. TAKAHASHI, et al., Selective Inhibition of IL-2 Gene Expression by Trichostatin A, a Potent Inhibitor of Mammalian Histone Deacetylase. The Journal of Antibiotics, 1996, 49 (5), p.453-7	1-19

国際調査報告

国際出願番号PCT/JPO3/16895

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)

法第8条第3項 (PCT 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 16, 17 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、
請求の範囲 16、17は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 1-19の一部 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、
特別ページを参照。
3. 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。

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)

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。

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なかった。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/16895

請求の範囲 1、2、16-19

請求の範囲 1、2、16-19 に記載された「HDAC4及び/又はHDAC8選択的阻害剤」として、実施例等により、その機能を有することが示されているのは、HDAC4ドミナントネガティブ変異体 (H802K、H803L、H863L) のみであり、これ以外の物質について何ら開示はなく、また、どのような物質が包含されるかが分からない。したがって、上記請求の範囲に記載された阻害剤については、明細書により十分な裏付けがされているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない、HDAC4ドミナントネガティブ変異体 (H802K、H803L、H863L) 以外の物質に係る発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 1-8、11-13、16-19

請求の範囲 1-8、11-13、16-19 に記載された方法において、HDAC酵素活性阻害と、GATA-1産生阻害、IL-2産生阻害活性及び免疫担当細胞増殖阻害との関係が、実施例等により確認されているのは、HDAC4についてのみであり、HDAC8についてはそれらの関係は確認されていない。HDACのアイソフォームでも、それぞれ活性が異なることを考えれば、HDAC4の実験データを基に、HDAC8がHDAC4と同様の活性を有することは、当業者であっても予測し得ない。したがって、上記請求の範囲に記載された方法のHDAC8に係る方法については、明細書により十分な裏付けがされているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない、HDAC8に係る発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 5-7、13

請求の範囲 5-7、13 に記載された方法において、HDAC4酵素活性阻害と比較されるために用いられるHDACアイソフォームの中で、そのHDAC酵素活性阻害と、GATA-1産生阻害、IL-2産生阻害活性及び免疫担当細胞増殖阻害との関係が、実施例等により確認されているのは、HDAC1及びHDAC3についてのみであり、HDAC2、HDAC5、HDAC6及びHDAC7についてはそれらの関係は確認されていない。HDACのアイソフォームでも、それぞれ活性が異なることを考えれば、HDAC1及びHDAC3の実験データを基に、HDAC2、HDAC5、HDAC6及びHDAC7が、HDAC1またはHDAC3と同様の活性を有することは、当業者であっても予測し得ない。したがって、上記請求の範囲に記載された方法のHDAC2、HDAC5、HDAC6及びHDAC7に係る方法については、明細書により十分な裏付けがされているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない、HDAC2、HDAC5、HDAC6及びHDAC7に係る発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 8

請求の範囲 8 における「部分精製された酵素液」は、何を含んでいるか不明である。したがって、上記請求の範囲に記載された方法は、明細書により十分な裏付けがされているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 9/78 (2006.01)	C 1 2 N	9/78	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q	1/66	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68	

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

(72) 発明者 荒森 一朗

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

Fターム(参考) 2G045 CA11 CB01 FB01
 4B024 AA01 AA11 BA11 CA04 CA06 DA02 EA04 GA14 HA11 HA12
 4B050 CC03 CC04 DD07 LL01 LL03
 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ30 QQ43 QR08 QR42 QR48 QR56 QR66
 QS25 QS34 QX02 QX07
 4C084 AA02 AA17 DC32 NA14 ZA512 ZB072 ZC202

(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。