

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年9月23日(23.09.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/186913 A1

(51) 国際特許分類:
CI2N 15/11 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/003260

(22) 国際出願日: 2021年1月29日(29.01.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
62/992,381 2020年3月20日(20.03.2020) US

(71) 出願人: 国立大学法人筑波大学(**UNIVERSITY OF TSUKUBA**) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 Ibaraki (JP). 国立研究開発法人産業技術総合研究所(**NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY**) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 遠藤 博寿(**ENDO Hirotoshi**); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 鈴木 石根(**SUZUKI Iwane**); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 白岩 善博(**SHIRAIWA Yoshihiro**); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 間世田 英明(**MASEDA Hideaki**); 〒5638577 大阪府池田市緑丘1-8-3 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所(**CENTCREST IP ATTORNEYS**); 〒1040031 東京都中央区京橋2-8-2 1 仁大ビル9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) **Title:** METHOD FOR MODIFYING METHYLATED STATE OF GENOMIC DNA

(54) 発明の名称: ゲノムDNAのメチル化状態を改変する方法

(57) **Abstract:** It was discovered that, by introducing into a cell a single strand DNA having a base sequence homologous to the base sequence of a target DNA region, it is possible to modify the methylated state of genomic DNA around the target DNA and suppress gene expression.

(57) 要約: 標的DNA領域の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを細胞に導入することにより、標的DNA周辺のゲノムDNAのメチル化状態を改変させるとともに、遺伝子の発現を抑制することが可能であることを見出した。



WO 2021/186913 A1

明 細 書

発明の名称： ゲノムDNAのメチル化状態を改変する方法

技術分野

[0001] 本発明は、一本鎖DNAを利用して、ゲノムDNAのメチル化状態を改変する方法、および遺伝子の発現を抑制する方法に関する。

背景技術

[0002] 特定の遺伝子の発現を長期間抑制する技術としては、遺伝子組換え技術を用いてshRNA(短ヘアピンRNA)を転写するカセットをゲノム内に組み込む方法(RNAi)が、動物、植物を問わず多くの生物種で用いられている(非特許文献1)。また、陸上植物にのみ用いられる方法として、RdDM(RNA-directed DNA Methylation)の機構を利用し、標的遺伝子の発現を抑制する方法も報告されている(非特許文献2)。さらに、動物の培養細胞については、TALE、ZnF、dCas9といった特定の塩基配列を認識するタンパク質断片に、DNAのメチル化やヒストンの脱メチル化などを触媒する酵素を融合させ、特定の遺伝子の発現を制御する方法も報告されている(非特許文献3～5)。

[0003] しかしながら、これら遺伝子組換えやゲノム編集を利用した遺伝子発現制御技術は、目的の株を得るために比較的長時間を要する。また、ゲノム編集において塩基配列認識タンパク質を利用する場合、その作成は非常に煩雑な作業を伴い、当該タンパク質と宿主との相性がゲノム編集効率に影響を与えてしまうという問題もある。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Paddison P. J. et al., Genes Dev. 2002, 16, 948-958

非特許文献2: Marjori A. Matzke et al., Nature Reviews Genetics, 2014, 15, 394-408

非特許文献3: Morgan L. Maeder et al., Nature Biotechnology, 20

13, 31(12), 1137-1142

非特許文献4: Hui Chen et al., Nucleic Acids Research, 2014, 42(3), 1563-1574

非特許文献5: Angelo Amabile et al., cell, 2016, 167(1), 219-232

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、簡便かつ効率的にゲノムDNAのメチル化状態を改変する方法を提供することにある。本発明のさらなる目的は、当該メチル化状態の改変を介して、特定の遺伝子の発現を簡便かつ効率的に抑制する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、標的DNA領域の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを細胞に導入するだけで、標的DNA領域のゲノムDNAのメチル化状態を改変することが可能であることを見出した。また、本発明者らは、特定の遺伝子のセンス鎖の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを細胞に導入することにより、当該遺伝子領域周辺のメチル化状態を改変させ、長期に渡り、当該遺伝子の発現を特異的かつ顕著に抑制することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] 本発明は、より詳しくは、以下の態様を提供するものである。

[0008] (1) ゲノムDNAのメチル化状態を改変する方法であって、ゲノムDNA上でメチル化状態を改変することを望むDNA領域の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを細胞に導入することを特徴とする方法。

[0009] (2) ゲノムDNAにおける遺伝子の発現を抑制する方法であって、ゲノムDNA上で発現を抑制したい遺伝子のセンス鎖の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを細胞に導入することを特徴とする方法。

[0010] (3) 一本鎖DNAが50～120塩基である、(1)または(2)に記載の方法

。

- [0011] (4) 細胞が藻類である、(1)～(3)のいずれかに記載の方法。
- [0012] (5) ゲノムDNA上でメチル化状態を改変することを望むDNA領域の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを含む、ゲノムDNAのメチル化状態が改変された細胞を製造するための組成物またはキット。
- [0013] (6) ゲノムDNA上で発現を抑制したい遺伝子のセンス鎖の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを含む、ゲノムDNAにおける遺伝子の発現が抑制された細胞を製造するための組成物またはキット。

発明の効果

- [0014] 本発明によれば、一定の長さを持つ一本鎖DNAを細胞内に導入するという簡便な操作により、標的DNA領域の塩基のメチル化状態を改変し、それに伴い、特定の遺伝子の発現を効率的に抑制することが可能となる。本発明の方法は、RdDM依存のエピジェネティック編集のような特定のポリメラーゼに依存する方法ではないため、広範囲な生物種に応用可能である。また、塩基認識タンパク質を利用した方法と比較して、一度に複数かつ広範囲にわたって塩基のメチル化状態を改変することが可能である。

図面の簡単な説明

- [0015] [図1]一本鎖DNAを設計したDNA領域を示す図である。GPF遺伝子の5'側非翻訳領域に2か所(Prom1、Prom2；模式図A)、ORF内に4か所(ssDNA1、ssDNA2、ssDNA3、ssDNA4；模式図B)の塩基配列を基に一本鎖DNAを設計した。
- [図2]ssDNA1またはssDNA2の導入したハプト藻におけるGFPの発現抑制効率を示すグラフである。
- [図3]ssDNA1またはssDNA2の導入により蛍光が消失したハプト藻におけるGFP遺伝子の発現解析の結果を示す電気泳動写真(左)およびグラフ(右)である。
- [図4A]ssDNA1またはssDNA2の導入により蛍光が消失したハプト藻におけるプロモーターとオープンリーディングフレーム(ORF)の5'端を含む領域(領域1)におけるメチル化状態を解析した結果を示す図である。領域1は80のシ

トシン塩基を有し、その中から野生型（WT）と比較してメチル化の状態に変化があった塩基を抜粋した。枠内の数値はメチル化シトシンの割合を示す。

メチル化シトシンの割合：0-35%:白、35-70%:灰色、70-100%:黒。

[図4B]ssDNA1またはssDNA2の導入により蛍光が消失したハプト藻における、一本鎖DNAを設計したORF領域（領域2）におけるメチル化状態を解析した結果を示す図である。領域2は91のシトシン塩基を有し、その中から野生型（WT）と比較してメチル化の状態に変化があった塩基を抜粋した。枠内の数値はメチル化シトシンの割合を示す。メチル化シトシンの割合：0-35%:白、35-70%:灰色、70-100%:黒。

[図5]ssDNA2の導入量と発現抑制効率との相関を解析した結果を示すグラフである。

[図6]ssDNA2の鎖長と発現抑制効率との相関を解析した結果を示すグラフである。

[図7]一本鎖DNAを設計する領域と発現抑制効率との相関を解析した結果を示すグラフである。

[図8A]一本鎖DNAによる内在性遺伝子FCPの発現抑制を解析した結果を示す電気泳動写真である。図中、「WT」は野生型を、「B4」はFCP発現抑制株を示す。

[図8B]図8Aで電気泳動を行ったゲルの蛍光を測定した結果を示すグラフである。図中、「WT」は野生型を、「B4」はFCP発現抑制株を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明は、ゲノムDNAのメチル化状態を改変する方法を提供する。

[0017] 本発明の方法は、ゲノムDNA上でメチル化状態を改変することを望むDNA領域（標的ゲノムDNA領域）の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを細胞に導入することを特徴とする。

[0018] 「ゲノムDNAのメチル化」とは、ゲノムDNA中の塩基の炭素原子にメチル基修飾が付加される化学反応であり、本発明においては、主として、シトシンのピリミジン環の5位炭素原子へのメチル基の付加である。本発明における「

メチル化状態の改変」は、ゲノムDNAのメチル化の増加および減少（脱メチル化）の双方を含むが、主として、メチル化の増加である。ゲノムDNAのメチル化と遺伝子発現の抑制との関係は公知であり、後述する通り、本発明の方法によるゲノムDNAのメチル化の増加に伴い、特定の遺伝子の発現を抑制することができる。

[0019] ゲノムDNAのメチル化状態の変化は、真核細胞か原核細胞かを問わず生じることが知られており、本発明の方法においてゲノムDNAのメチル化状態を改変させる対象となる「細胞」としては特に制限はない。細胞は、例えば、藻細胞、植物細胞、動物細胞、真菌細胞などの真核細胞であっても、細菌や古細菌などの原核細胞であってもよい。

[0020] 藻類としては、ハプト藻、クリプト藻、褐藻、紅藻、緑藻、珪藻、黄金藻、灰色藻、ユーグレナ藻、シャジク藻、渦鞭毛藻などの真核藻類およびシアノバクテリアなどの原核藻類が挙げられる。植物としては、種子植物、シダ植物、コケ植物が挙げられ、実験上あるいは産業上有用な植物としては、シロイヌナズナ、トマト、ダイズ、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、ナタネ、タバコ、バナナ、ピーナツ、ヒマワリ、ジャガイモ、ワタ、カーネーションを例示することができる。動物としては、例えば、哺乳類（マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジなど）の他、魚類、鳥類、爬虫類、両生類、昆虫類が挙げられる。

[0021] 「細胞」は、培養細胞の他、個体中の細胞も含まれる。また、プロトプラストなど、一本鎖DNAを導入するための特定の処理が施された細胞も含まれる。

[0022] 本発明の方法において、細胞に導入する「一本鎖DNA」は、ゲノムDNA上でメチル化状態を改変することを望むDNA領域（標的ゲノムDNA領域）の標的鎖の塩基配列と相同な塩基配列を有する。本発明によれば、任意のゲノムDNA領域をメチル化状態の改変の対象とすることができる。また、「標的鎖」は、ゲノムDNAの二本鎖のうち、本発明の一本鎖DNAに相同な塩基配列を有し、本

発明の一本鎖DNAを設計する基となる鎖である。例えば、本発明の一本鎖DNAを利用して遺伝子領域のメチル化を行う場合には、標的鎖は、センス鎖である。ここで「センス鎖」とは、ゲノムDNAの二本鎖のうち、転写の鋳型にならない側の鎖を意味する。

[0023] 一本鎖DNAの鎖長は、メチル化状態を改変できる限り、特に制限はないが、例えば、40～200塩基、好ましくは50～120塩基である。

[0024] 一本鎖DNAと標的ゲノムDNA領域との相同性は、ゲノムDNAのメチル化状態を改変できる限り、必ずしも100%でなくともよい。相同性は、例えば、90%以上（例えば、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）であり得る。配列の相同性は、BLAST等（例えば、デフォルトのパラメータ）を利用して算出できる。

[0025] 一本鎖DNAの細胞への導入は、細胞の種類や形態などに応じて、適宜選択することができる。例えば、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、ポリエチレングリコール（PEG）法、DEAE-デキストラン法、リポフェクション、ナノ粒子媒介性トランスフェクション、ウイルス媒介性核酸送達などが挙げられるが、これらに制限されない。

[0026] 細胞に導入する一本鎖DNAの濃度は、ゲノムDNAのメチル化状態を改変できる限り制限はなく、一本鎖DNAの鎖長や導入する細胞の種類に応じて、当業者は適宜設定することができるが、例えば、 10^5 細胞あたり1ng～50 μ gであり、好ましくは 10^5 細胞あたり6ng～8 μ gである。

[0027] 本発明の方法によるメチル化状態の変化は、例えば、バイサルファイトシークエンス法、メチル化特異的PCR（MSP）法、定量的MSP法、COBRA法、パイロシークエンス法などの公知の方法により解析することができ、対照（例えば、一本鎖DNAを導入しない場合）と比較したメチル化状態の相違をメチル化状態の改変として評価することができる。

[0028] 本発明の方法によるメチル化状態の改変は、ゲノムDNAにおいて一本鎖DNAを設計した塩基のみならず、その近傍にも生じる。ここで「近傍」とは、一本鎖DNAを設計した塩基配列の5'端から上流300塩基以内の領域および一本鎖D

NAを設計した塩基配列の3'端から下流300塩基以内の領域である。但し、一本鎖DNAを設計した塩基配列から、さらに離れた塩基のメチル化状態が改変されることを除外するものではない。

[0029] 本発明の方法により、遺伝子領域のメチル化状態を改変することにより、当該遺伝子の発現を抑制することができる。従って、本発明は、ゲノムDNAにおける遺伝子の発現を抑制する方法であって、ゲノムDNA上で発現を抑制したい遺伝子（標的遺伝子）のセンス鎖の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを細胞に導入することを特徴とする方法をも提供する。遺伝子発現の抑制を目的とする場合、一本鎖DNAを設計する領域は、好ましくは、遺伝子のオープンリーディングフレーム領域である。本発明の方法によれば、長期に渡り、遺伝子の発現を特異的かつ顕著に抑制することが可能である。

[0030] また、本発明は、上記一本鎖DNAを含む、ゲノムDNAのメチル化状態が改変された細胞を製造するための、または、ゲノムDNAにおける遺伝子の発現が抑制された細胞を製造するための組成物またはキットを提供する。

[0031] 本発明のキットを構成する標品および本発明の組成物には、必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。他の成分としては、例えば、基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、保湿剤、着色料、香料、キレート剤等が挙げられるが、これらに制限されない。

[0032] 本発明のキットは、さらに追加の要素を含むことができる。追加の要素としては、例えば、希釈緩衝液、洗浄緩衝液、核酸導入試薬、対照試薬（例えば、対照の一本鎖DNAなど）が挙げられるが、これらに制限されない。当該キットは、本発明の方法を実施するための使用説明書を含んでもよい。

実施例

[0033] [材料と方法]

(1) 実験対象種

GFP(Green Fluorescence Protein)の発現抑制に関する実験では、ハプト藻類 (*Pleurochrysis carterae* LU株) にGFP遺伝子およびAph7遺伝子 (ハ

イグロマイシン耐性遺伝子)を組み込んだSG-2株(GFPを恒常的に発現する株)を実験対象種として用いた。また、FCP(Fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein)に関する実験では、ハプト藻類(*Pleurochrysis carterae* LU株)の野生株を用いた。細胞は、Marine Art-ESM培地を用いて、20℃にて明期16時間／暗期8時間で培養した。

[0034] (2) プロトプラストの調製と一本鎖DNAの導入

定常期後期の細胞培養液から遠心で細胞を集め、Protanase Kで30℃、3時間(振とう)、20℃で1時間(静置)処理した。集めた細胞をhypo-osmotic buffer中で5～10分間処理し、細胞壁を除去した。得られたプロトプラストをMiracloth(EMD millipore)でフィルタリングし、遠心で集め、0.4M マンニトール溶液に懸濁した。懸濁液を再び遠心し、上清を破棄したのち、再度、0.4M マンニトール溶液に懸濁し、細胞数をカウントした。再度、プロトプラスト懸濁液を遠心し、 4.2×10^5 の細胞を320 μ LのMaMg bufferに懸濁し、300 μ Lのミリポア水に溶解した30 μ gの一本鎖DNAと混合した。

[0035] なお、GFPの発現抑制実験に用いた一本鎖DNAの鎖長は100塩基で、GFP遺伝子のORF内の2つの領域のセンス鎖と同一の配列を持つ(以下、「ssDNA1」、「ssDNA2」とする)。また、FCPの発現抑制実験に用いた一本鎖DNAの鎖長も同様に100塩基でFCP遺伝子のORFの一部分のセンス鎖と同一の配列を有する。

[0036] 一本鎖DNAを入れたプロトプラスト懸濁液を暗所で10分間静置した後、350 μ Lの40% PEG(MW=6,000、WAKO)CMS溶液を注ぎ、よく攪拌した後、20℃の明所にて15分間静置した。上記の処理を行ったプロトプラスト懸濁液を7.5mLの培地で洗浄し、2mLの培地で懸濁し、培養を行った。

[0037] 使用した溶液の組成の組成は、以下の通りである。

- [0038] ・hypo-osmotic buffer (HEPES 10mM、KCl 100mM、NaOH 350 μ M)
- ・MaMg buffer (マンニトール 400mM、MgCl₂ 15mM、MES 0.1%(w/v)、pHはKOHで5.8に調整)
- ・40% PEG in CMS溶液 (PEG 4g、CMS溶液 6mL)
- ・CMS溶液 (マンニトール 400mM、Ca(NO₃)₂ 100mM、pHはKOHで7.0に調整)

)

(3) GFP蛍光発現抑制効率の算出

ssDNA1またはssDNA2の導入の約1週間後に、フローサイトメトリーを用いて GFP蛍光発色細胞と蛍光消失細胞の割合を測定した。また、一本鎖DNAの導入を行わなかった実験区を対照実験区として、同時に測定を行った。なお、発現抑制効率は、以下の式により定義した。

$$100 - [(\text{一本鎖DNA導入実験区の蛍光発色細胞数} / \text{対照実験区の蛍光発色細胞数}) \times 100] (\%)$$

この式においては、例えば、発現抑制効率が80%である場合、80%の細胞において蛍光が消失していることになる。

[0039] (4) 長期的な発現抑制が生じた細胞の単離

(2) で得られた細胞を約2週間液体培地で培養した後、ゲランガム0.2%を含む1/2濃度のMA-ESMプレート培地で培養を行った。2週間後、プレート上に形成されたコロニーを蛍光実態顕微鏡下で観察し、GFPの蛍光を完全に消失しているコロニーを単離し、再度、液体培地で約4週間培養を行った。培養後、フローサイトメトリーを用いて蛍光の消失を確認した後、ssDNA1またはssDNA2を導入した実験区からそれぞれ1コロニーずつ選び（それぞれ「ssD1」、「ssD2」と称する）、RNAおよびゲノムDNAの抽出を行った。

[0040] (5) GFP mRNAの発現解析

(4) で抽出したRNAを用いて、GFP特異的プライマーを用いて発現解析を行った。また、ポジティブコントロールとして、ハウスキーピング遺伝子であるFCP遺伝子の発現も同時に確認した。

[0041] (6) ゲノムのメチル化の解析

(3) で得られたゲノムDNAをFast Bisulfite Conversion Kit(abcam社)を用いてバイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理により、メチル化されていないC（シトシン塩基）が脱アミノ化され、U（ウラシル塩基）に変換される。この処理後にPCRを行うことにより、メチル化されていないCはT（チミン塩基）に置換され、Cのメチル化および非メチル化を検出できる

。

[0042] バイサルファイト処理を行ったゲノムDNAを鋳型に、GFPのプロモーター領域とORFを含む領域（領域1）および導入した一本鎖DNAを設計したORF領域（領域2）をPCRで増幅し、TAクローニングを行い、大腸菌（JM109株）に導入した。また、バイサルファイト処理を行わないゲノムDNAを鋳型に、領域1と領域2のPCRおよびクローニングを行い、対照配列とした。各実験区からそれぞれ12クローンずつ大腸菌を単離して培養し、PCRで増幅した断片の配列決定を行い、メチル化の割合を算出した。

[0043] （7）導入する一本鎖DNAの検討

GFPの一本鎖DNAについては、以下の条件検討を行った。

[0044] （a）一本鎖DNAの導入量

上記（2）の操作において、ssDNA2を 4.2×10^5 細胞あたり5ng、10ng、25ng、50ng、75ng、100ng、125ng、500ng、 $1 \mu\text{g}$ 、 $1.5 \mu\text{g}$ の各量となるように調整して導入し、上記（3）の手順で発現抑制効率を算出した。

[0045] （b）一本鎖DNAの鎖長

上記（2）の操作において、40塩基、50塩基、60塩基、80塩基、100塩基の各鎖長にしたssDNA2を作成し、それぞれ 4.2×10^5 細胞あたり4ng、5ng、6ng、8ng、10ngとなるように量を調整して導入し、上記（3）の手順で発現抑制効率を算出した。

[0046] （c）一本鎖DNAを設計する領域

GPF遺伝子の5'側非翻訳領域に2か所(Prom1、Prom2；模式図A)、ORF内に2か所（中央付近と3'端付近；ssDNA3、ssDNA4；模式図B）に80塩基からなる一本鎖DNAを設計し（図1）、（2）の手順で 4.2×10^5 細胞あたり $10 \mu\text{g}$ 導入し、（3）の手順で発現抑制効率を算出した。

[0047] （8）内在性遺伝子FCP(Fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein)を用いた応用実験

FCPは光合成色素と結合し、光受容体を形成するタンパク質であり、この遺伝子の発現が抑制されると受容体が縮小し、細胞の色彩が薄くなる。P. car

teraeでは、この遺伝子は7種類の配列からなるファミリーを形成しているが、このうち最も発現量の高いタイプの配列をもとに80塩基の鎖長の一本鎖DNAを合成し、細胞内に導入した。培養後、色が薄く変化している細胞を単離して再培養し、FCP遺伝子の発現解析を行った。

[0048] [結果]

(1) ssDNA1またはssDNA2の導入によるGFPの発現抑制

図2に示すように、ssDNA1およびssDNA2のGFP発現抑制効率は、それぞれ約83.8%および87.5%であった。

[0049] (2) ssDNA1またはssDNA2の導入によるGFP発現抑制

図3に示すように、単離した蛍光消失株についてGFP遺伝子の発現解析を行った。その結果、ssDNA1およびssDNA2のいずれを導入した株においてもGFP遺伝子の発現はコントロールと比較して1%以下に抑制されていた。

[0050] (3) メチル化状態の解析

上述の単離した2つの株について、プロモーターとORFの5'端を含む領域（領域1）および導入した一本鎖DNAを含むORFの領域（領域2）についてメチル化状態を調べた。図4に示すように、単離した株においてはメチル化および脱メチル化の両方が確認されたが、新たにメチル化されている部位がより多く見られた。また、領域1に比べ、領域2の方により顕著な差が見られた。

[0051] (4) 一本鎖DNAの導入量と発現抑制効率

ssDNA2を用いて、導入量と発現抑制効率について相関を調べた。図5に示すように、 4.2×10^5 細胞あたり25ng～30μgまではおおむね70%以上の抑制効率を示したが、10ngおよび5ngの実験群では抑制効率は著しく低下した。

[0052] (5) 一本鎖DNAの鎖長と発現抑制効率

ssDNA2の領域で40塩基、50塩基、60塩基、80塩基の各鎖長の一本鎖DNAを設計し、導入する一本鎖DNAの鎖長と発現抑制効率についての相関を調べた。図6に示したように、40塩基の鎖長の一本鎖DNAを用いた場合、著しく効率が低下した。

[0053] (6) 一本鎖DNAの設計領域と発現抑制効率

一本鎖DNAをORFとプロモーターのいくつかの領域に設計し、発現抑制効率との相関を調べた。その結果、図7に示すように、ORF内に設計した一本鎖DNAはいずれも75%以上の抑制効率が見られたが、プロモーター領域に設計したものでは抑制効率は著しく低かった(5%程度)。

[0054] (7) 内在性遺伝子FCPを用いた遺伝子発現抑制実験

FCPの一本鎖DNAを導入後、色が薄くなったコロニーを単離し、FCP遺伝子の発現解析を行った。図8に示すように、7つのサブタイプのうち、type 5を除くすべての発現が抑制されていた。

産業上の利用可能性

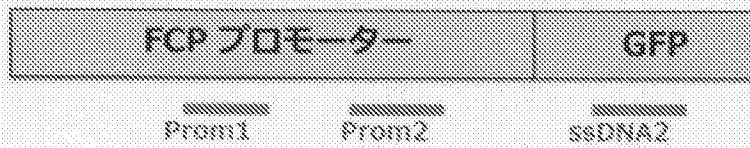
[0055] 本発明によれば、ゲノムDNAのメチル化状態の改変および特定の遺伝子の発現の抑制により、様々な細胞や個体の機能を改変することが可能となることから、本発明は、工業、農業、医療を含む幅広い分野での利用が期待される。例えば、微細藻類であるハプト藻に本発明を適用することにより、高脂質生産株や有用脂質高生産株の作出を効率的に行うことが可能である。本発明を利用すれば、遺伝子組換えを行うことなく、改変された機能を持つ細胞や個体が得られるため、遺伝子組換え個体などと比較して、規制（例えば、カルタヘナ法）による設備等に対する制限が少ない点でも産業応用に有利である。

請求の範囲

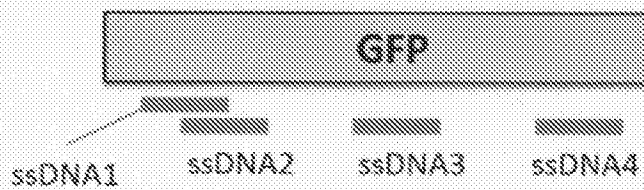
- [請求項1] ゲノムDNAのメチル化状態を改変する方法であって、ゲノムDNA上でメチル化状態を改変することを望むDNA領域の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを細胞に導入することを特徴とする方法。
- [請求項2] ゲノムDNAにおける遺伝子の発現を抑制する方法であって、ゲノムDNA上で発現を抑制したい遺伝子のセンス鎖の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを細胞に導入することを特徴とする方法。
- [請求項3] 一本鎖DNAが50～120塩基である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 細胞が藻類である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] ゲノムDNA上でメチル化状態を改変することを望むDNA領域の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを含む、ゲノムDNAのメチル化状態が改変された細胞を製造するための組成物またはキット。
- [請求項6] ゲノムDNA上で発現を抑制したい遺伝子のセンス鎖の塩基配列と相同な塩基配列を有する一本鎖DNAを含む、ゲノムDNAにおける遺伝子の発現が抑制された細胞を製造するための組成物またはキット。

[図1]

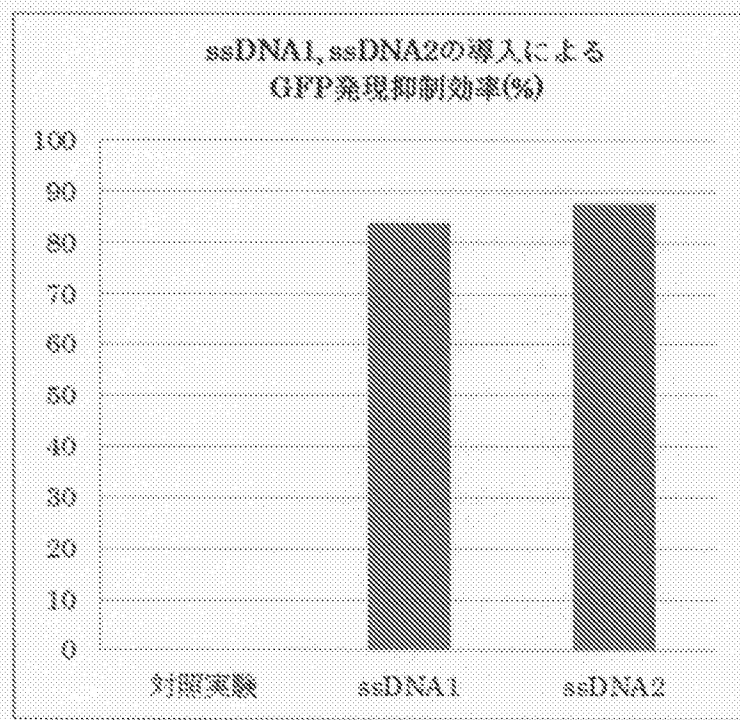
<模式図A>



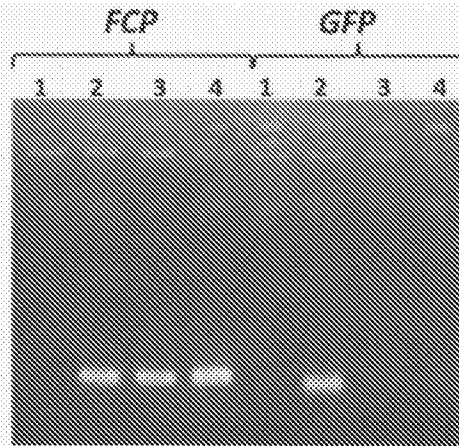
<模式図B>



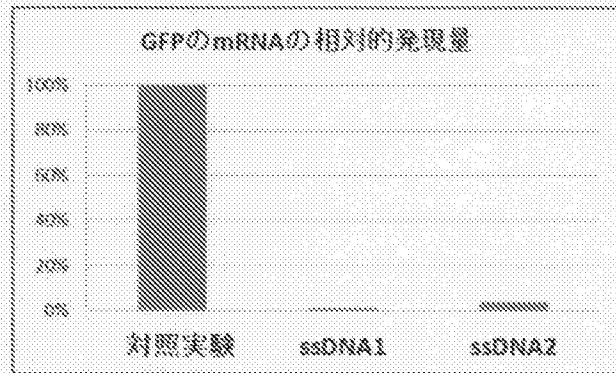
[図2]



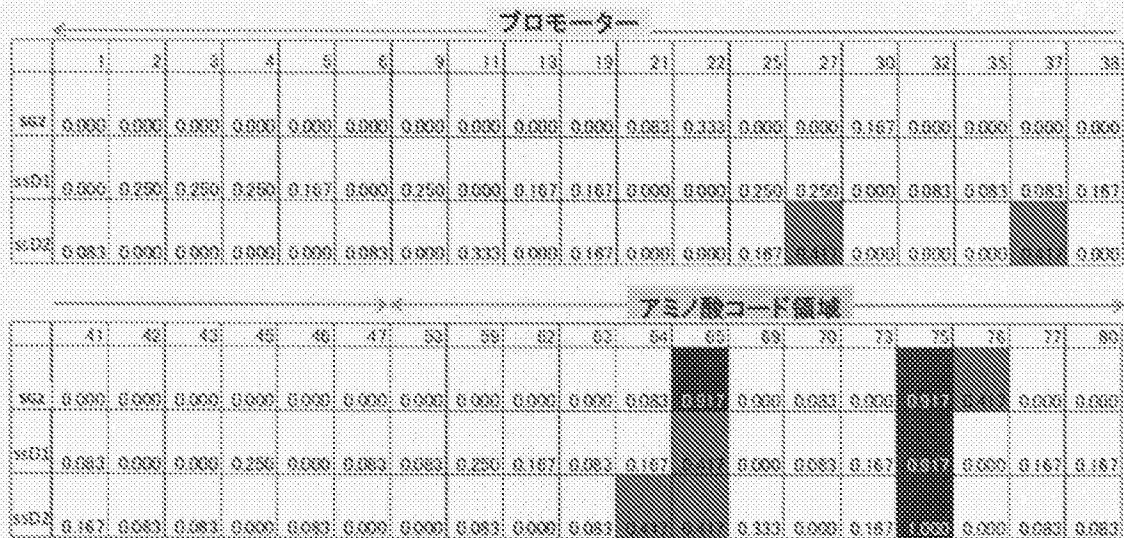
[図3]



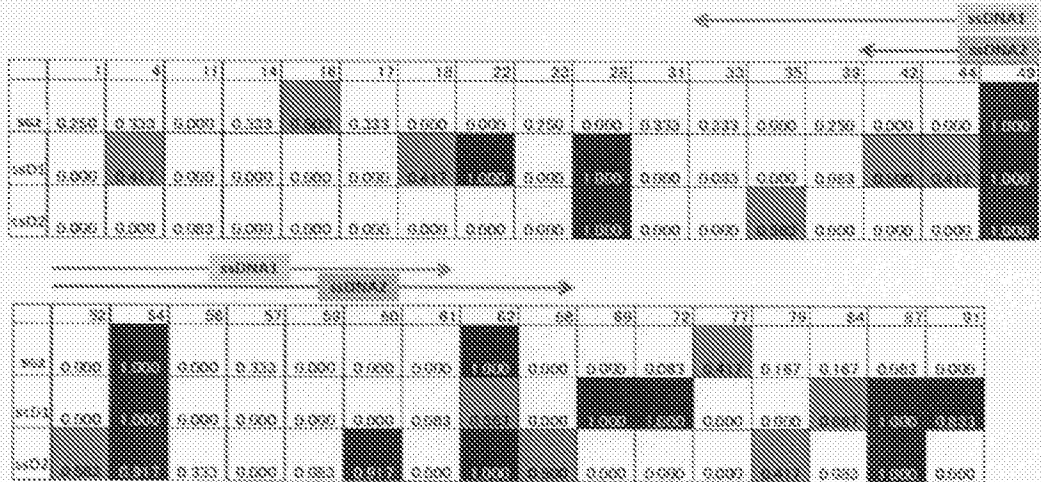
1. 精製なし, 2. ssDNAなし,
3. ssDNA1, 4. ssDNA2



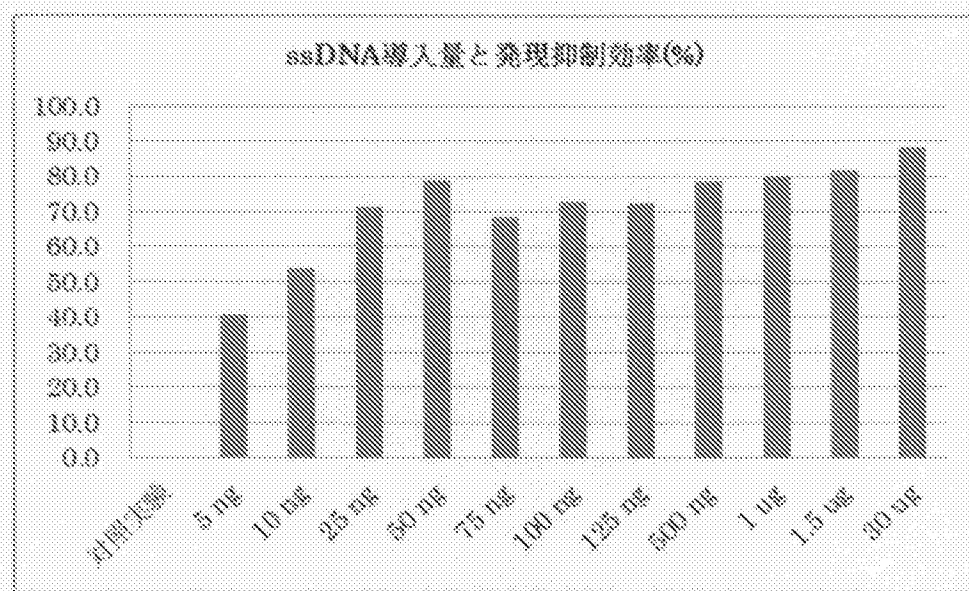
[図4A]



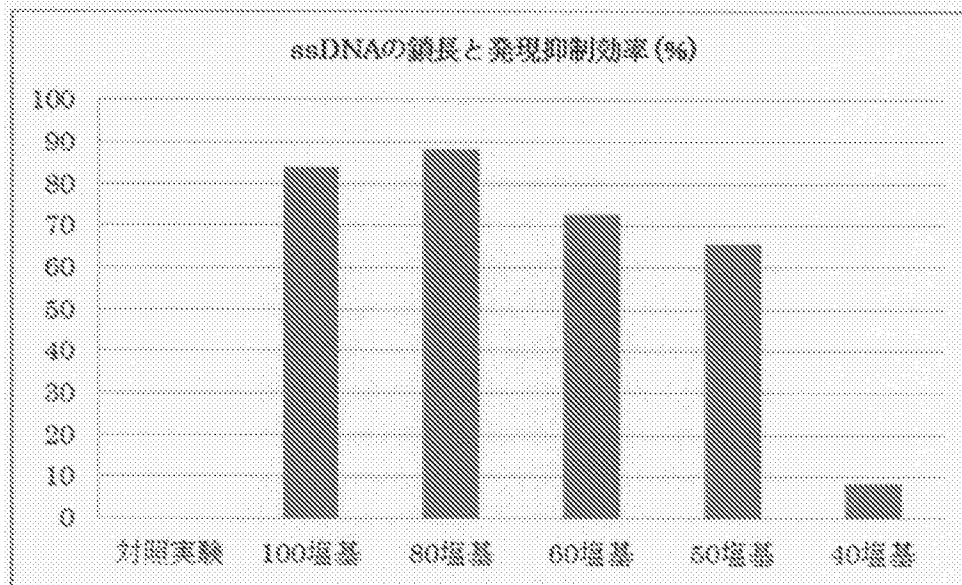
[図4B]



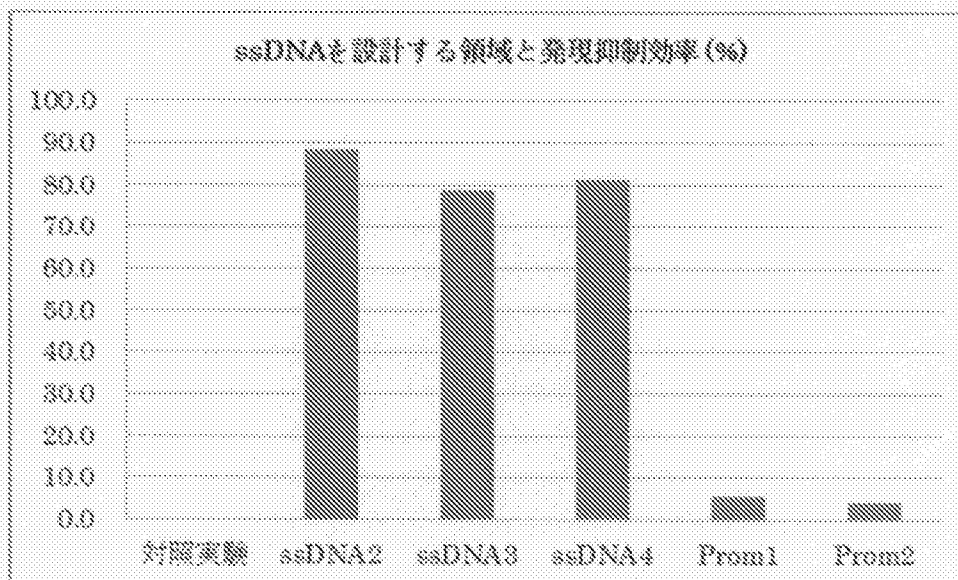
[図5]



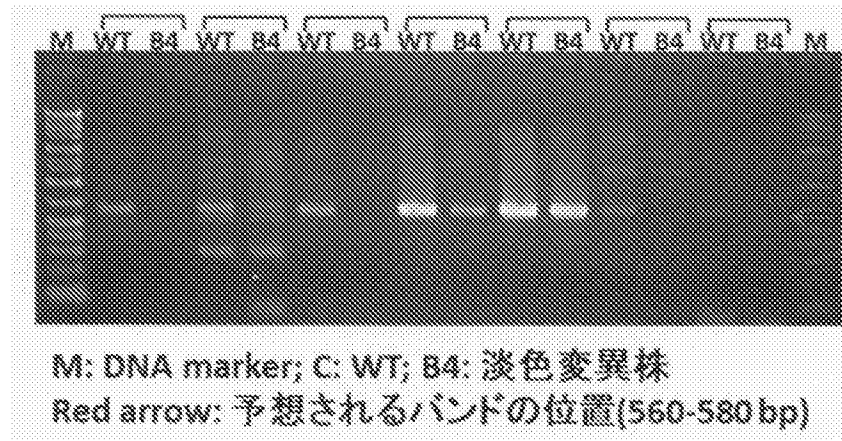
[図6]



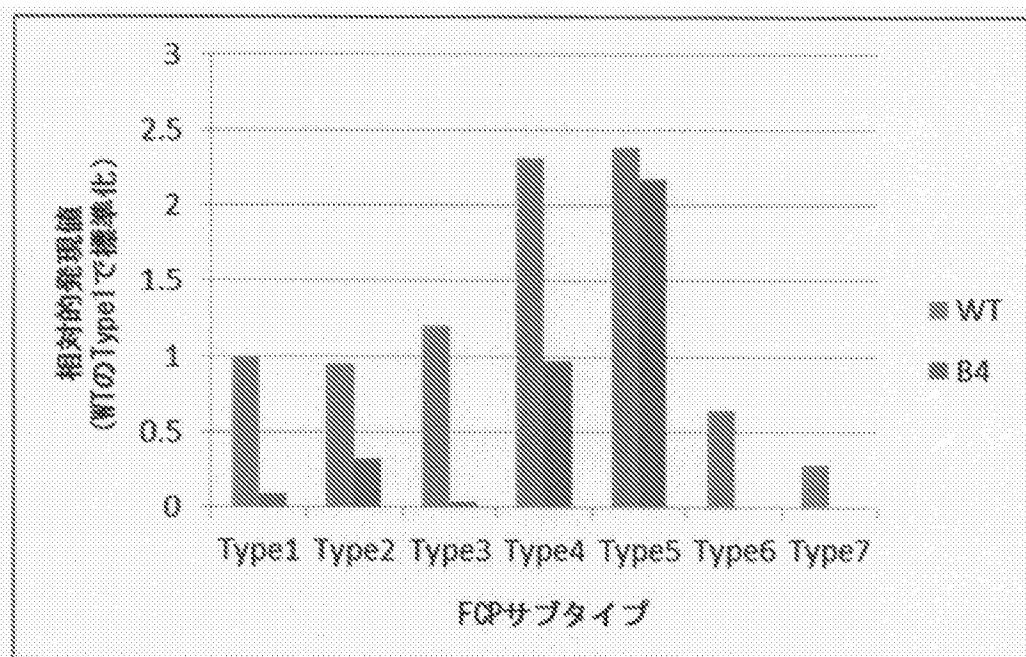
[図7]



[図8A]



[図8B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/003260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12N15/11 (2006.01) i

FI: C12N15/11 Z

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. C12N15/11

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021

Registered utility model specifications of Japan 1996-2021

Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/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	森田純代他, 特定のゲノム領域を DNA 脱メチル化する手法の開発, 化学と生物, 2017, vol. 55, no. 5, pp. 359-363, Introduction, non-official translation (MORITA, Sumiyo et al. DNA Demethylation Method in Specific Genome Regions. Kagaku to Seibutsu.)	1-6
Y	WO 2018/030536 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA) 15 February 2018, paragraphs [0002]-[0005], claims, examples	1-6
Y	WO 2004/015117 A2 (NEDERLANDS KANKER INSTITUUT) 19 February 2004, claims, examples	1-6

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16.02.2021

Date of mailing of the international search report
20.04.2021

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/003260

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2018/030536 A1	15.02.2018	US 2019/0284581 A1 paragraphs [0002]- [0007], claims, examples	
WO 2004/015117 A2	19.02.2004	GB 218803 DO claims, examples	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/11(2006.01)i FI: C12N15/11 Z		
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）） C12N15/11		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/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 請求項の番号
Y	森田 純代他, 特定のゲノム領域をDNA脱メチル化する手法の開発, 化学と生物, 2017, vol.55, No.5, p.359-363 「はじめに」の欄等	1-6
Y	WO 2018/030536 A1 (国立大学法人徳島大学) 15.02.2018 (2018-02-15) [0002]-[0005]、特許請求の範囲、実施例等	1-6
Y	WO 2004/015117 A2 (NEDERLANDS KANKER INSTITUUT) 19.02.2004 (2004-02-19) claims, examples	1-6
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 16.02.2021	国際調査報告の発送日 20.04.2021	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 松原 寛子 4B 4154 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/003260

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2018/030536	A1	15.02.2018	US	2019/0284581	A1	
				[0002]-[0007], claims, examples			
WO	2004/015117	A2	19.02.2004	GB	218803	D0	
				claims, examples			