

(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
2017 年 6 月 1 日(01.06.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/090724 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/084958
- (22) 国際出願日: 2016 年 11 月 25 日(25.11.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-229896 2015 年 11 月 25 日(25.11.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 群馬大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目 2 番地 Gunma (JP).
- (72) 発明者: 畑田 出穂 (HATADA, Izuhō); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目 2 番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 森田 純代 (MORITA, Sumiyo); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目 2 番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 堀居 拓郎 (HORII, Takuro); 〒3718510 群馬県前橋市荒

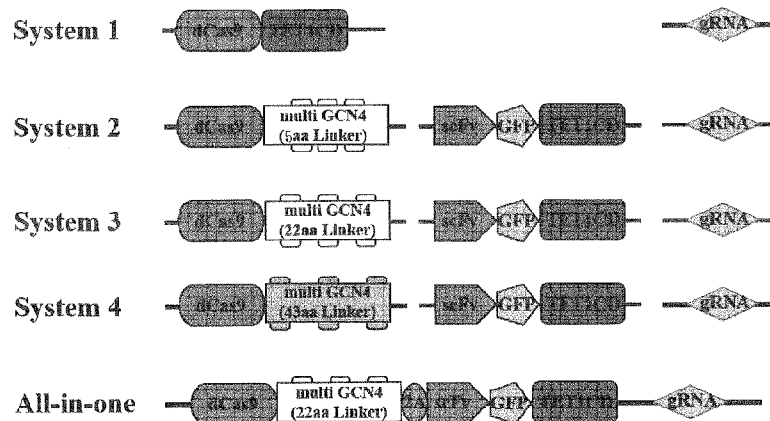
牧町四丁目 2 番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP).

- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目 4 番 10 号 アクロポリス 21 ビル 8 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, JP, KE, KG, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, 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),

[続葉有]

(54) Title: DNA METHYLATION EDITING KIT AND DNA METHYLATION EDITING METHOD

(54) 発明の名称: DNA メチル化編集用キットおよび DNA メチル化編集方法



(57) Abstract: A DNA methylation editing kit including: (1) a fused protein of inactivated CRISPR-associated endonuclease Cas9 (dCas9) having no nuclease activity and a tag peptide array in which a plurality of tag peptides are linked by linkers, or RNA or DNA encoding the fused protein; (2) a fused protein of a tag peptide binding site and a methylase or demethylase, or RNA or DNA encoding the fused protein; and (3) guide RNA (gRNA) that includes a sequence complementary to a DNA sequence within 1 kb of a desired site of methylation or demethylation, or DNA expressing the gRNA.

(57) 要約: (1)ヌクレアーゼ活性を有しない不活性化型 CRISPR-associated endonuclease Cas9 (dCas9) と、タグペプチドがリンカーを挟んで複数つながったタグペプチドアレイとの融合蛋白質、またはそれをコードする RNA もしくは DNA、(2) タグペプチド結合部位と、メチル化酵素もしくは脱メチル化酵素との融合蛋白質、またはそれをコードする RNA もしくは DNA、および (3) メチル化または脱メチル化を所望する部位から 1 kb 以内の DNA 配列と相補的な配列を含むガイド RNA (gRNA)、またはそれを発現する DNA を含む、DNA メチル化編集用キット。

WO 2017/090724 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

DNAメチル化編集用キットおよびDNAメチル化編集方法

技術分野

[0001] 本発明は、DNAメチル化編集用キットおよびDNAメチル化編集方法に関するものである。

背景技術

[0002] 遺伝子DNAのシトシンのメチル化は遺伝子発現を制御するエピジェネティクス（エピゲノム）の代表的修飾である。特定の遺伝子のメチル化を制御できれば、癌などのエピゲノム疾患の解明やモデル作製、さらにはエピゲノム治療への応用が可能である。現在は、5-アザシトシンなどによるゲノム全体の脱メチル化を使った癌の治療が実用化されているが、すべての遺伝子に影響するので安全性に関しては疑問が残る。そのため、特定部位のメチル化を制御する技術の開発が望まれていた。

[0003] 特定部位のメチル化を制御する技術としては、これまでに、脱メチル化に関与する酵素であるTET1の触媒部位とTALENを融合させたタンパク質を用いた、特定遺伝子の脱メチル化技術の報告がある（非特許文献1）。しかし、旧世代のゲノム編集技術TALENを用いているので、非常に手間がかかる上に、脱メチル化できる程度はそれほど高くなかった。

[0004] 新世代のゲノム編集法としては、CRISPR/Cas（非特許文献2）を用いる方法が挙げられる。CRISPR/Cas ゲノム編集法としては、ペプチドエピトープが複数つながったアレイと、一本鎖抗体であるscFvを用いて、シグナル増幅に適用することは報告されているものの（非特許文献3）、当該方法をDNAメチル化の制御に適用することは知られていない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Maeder ML et al. Nat Biotechnol, 31, 1137-1142, 2013

非特許文献2：実験医学（羊土社）2014年7月号 第1690～1714頁

非特許文献3：Tanenbaum ME et al. Cell 159, 635–646, 2014

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、上記の問題点に鑑み、DNAメチル化編集用キットおよびDNAメチル化編集方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、前述の課題を解決すべく鋭意検討した結果、CRISPR/Cas ゲノム編集法を用いることにより、特定部位のメチル化を効果的に制御することが可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明は以下を要旨とする。

[1] (1) ヌクレアーゼ活性を有しない不活性化型CRISPR-associated endonuclease Cas9 (dCas9) と、タグペプチドがリンカーを挟んで複数つながったタグペプチドアレイとの融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA、

(2) タグペプチド結合部位 (tag peptide binding portion) と、メチル化酵素もしくは脱メチル化酵素との融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA、および

(3) メチル化または脱メチル化を所望する部位から 1 kb以内のDNA配列と相補的な配列を含むガイドRNA (gRNA) 、またはそれを発現するDNAを含む、DNAメチル化編集用キット。

[2] 前記脱メチル化酵素が、Ten-eleven translocation 1の触媒部位 (TET1CD) である、[1] に記載のDNAメチル化編集用キット。

[3] 前記メチル化酵素が、DNA Methyltransferase 3 beta (DNMT3B) である、[1] に記載のDNAメチル化編集用キット。

[4] 前記タグペプチドがペプチドエピトープであり、前記タグペプチド結合部位が抗ペプチドエピトープ抗体である、[1] ～ [3] のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

〔５〕前記ペプチドエピトープがGeneral Control Non-derepressible 4 (GCN4) ペプチドエピトープであり、前記抗ペプチドエピトープ抗体が抗GCN4ペプチドエピトープ抗体である、〔４〕に記載のDNAメチル化編集用キット。

〔６〕前記ペプチドエピトープがHisタグまたはEEタグであり、前記抗ペプチドエピトープ抗体が抗Hisタグ抗体または抗EEタグ抗体である、〔４〕に記載のDNAメチル化編集用キット。

〔７〕前記抗体が一本鎖抗体 (scFv) である、〔４〕～〔６〕のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

〔８〕前記タグペプチドがスプリットタンパク質のsmallフラグメントであり、前記タグペプチド結合部位がスプリットタンパク質のlargeフラグメントである、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

〔９〕前記スプリットタンパク質がGFPである、〔８〕に記載のDNAメチル化編集用キット。

〔１０〕前記タグペプチドがGVKESLVであり、前記タグペプチド結合部位がPDZ proteinである、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

〔１１〕前記リンカーが５～１００アミノ酸である、〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

〔１２〕前記リンカーが５～５０アミノ酸である、〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

〔１３〕前記リンカーが１０～５０アミノ酸である、〔１〕～〔１２〕のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

〔１４〕前記（１）および／または（２）の融合蛋白質が、さらに選択マーカを含む、〔１〕～〔１３〕のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

〔１５〕前記gRNAが複数である、〔１〕～〔１４〕のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

〔１６〕前記（１）～（３）のDNAが全て一つのベクターに含まれている、〔

1] ～ [15] のいずれかに記載のDNAメチル化編集用キット。

[17] 下記(1)～(3)を細胞にトランスフェクションする工程を含む、DNAメチル化編集方法。

(1)ヌクレアーゼ活性を有しない不活性化型CRISPR-associated endonuclease Cas9 (dCas9) と、タグペプチドがリンカーを挟んで複数つながったタグペプチドアレイとの融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA、

(2)タグペプチド結合部位と、メチル化酵素もしくは脱メチル化酵素との融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA、および

(3)メチル化または脱メチル化を所望する部位から1 kb以内のDNA配列と相補的な配列を含むガイドRNA (gRNA)、またはそれを発現するDNA。

[18] 前記(1)および／または(2)の融合蛋白質が、さらに選択マーカを含む、[17]に記載のDNAメチル化編集方法。

[19] 前記選択マーカを発現する細胞を選択して回収する工程をさらに含む、[18]に記載のDNAメチル化編集方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、特定部位のDNAメチル化を制御すること、たとえば、メチル化部位を脱メチル化すること、および、非メチル化部位をメチル化することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]トランスフェクションしたベクターの構成要素を示す図(実施例1)。

[図2] (a) STAT3結合部位をおよびマウスGfap部位を示す図。当該STAT3結合部位は、メチル化感受性CpG部位(TTCCGAGAAにおけるCG))を有する。gRNA

(Gfap1-3)として使用されたターゲット1～3を、黒の太い横棒で示す。(b) Gfap1-3をターゲットとするgRNAを使用した、TET1触媒ドメイン(TET1CD)に直接結合されたdCas9(システム1)の脱メチル化活性を示すグラフ。縦軸は、表中の数式(下記数式1と同じ)により計算された値を、標準化された脱メチル化%として表す。

[図3] (a) dCas9および繰り返しペプチドアレイに基づく脱メチル化増幅の

スキームを示す図。繰り返しペプチドアレイと融合したヌクレアーゼ活性を有しない不活性化型Cas9 (dCas9) は、複数のscFv抗体-融合TET1CDをリクルートすることができる。そのため、当該複数のTET1CDは、より効果的にターゲットを脱メチル化することができる。(b) dCas9に融合した、各々のGCN4ペプチドエピトープを分離するリンカーの長さが、短すぎる場合(左)、適切な場合(中央)、および長すぎる場合(右)を示す図。

[図4] (a) 縦軸は、下記数式1により計算された値を、標準化された脱メチル化%として表す。横軸は、使用したベクターの構成及びソーティングの有無を示す。gRNAはGfapのターゲット2を使用した。(b) ターゲット部位周辺のメチル化を示す図。システム3およびGfap2をターゲットとするgRNAまたはコントロールgRNAをトランスフェクトしたESCsが、GFPによりソートされ、バイサルファイトシーケンスによりメチル化を解析した。黒白スタイルの円は、メチル化のパーセントを表しており、黒はメチル化、白は非メチル化を示す。円の下に数字は、各々の位置を表す。2つの群(Gfapとコントロール)における全てのCpG部位セットの間の統計的有意は、マンホイットニーUテストで評価された。

[図5] Gfap2をターゲットとするgRNAのオフターゲット部位1~3周辺のメチル化を示す図。システム3およびGfap2をターゲットとするgRNAをトランスフェクトしたESCsが、GFPによりソートされ、バイサルファイトシーケンスによりオフターゲット部位1~3周辺のメチル化を解析した。黒白スタイルの円は、メチル化のパーセントを表しており、黒はメチル化、白は非メチル化を示す。円の下に数字は、各々の位置を表す。2つの群(Gfapとコントロール)における全てのCpG部位セットの間の統計的有意は、マンホイットニーUテストで評価された。下線で示した配列の部分はGfap2ターゲットと塩基配列が一致する箇所を示す。

[図6] (a) CTCF結合部位およびマウスH19部位を示す。CTCF結合部位はメチル化感受性CpG部位(m1~m4)を有する。gRNAのターゲットに使用された部位1~4を、m1~m4を示す縦長のバーの下に示す。(

b) システム 1、3、およびシステム 3+ソーティングを使用した、CTCF 結合部位における m2 の脱メチル化を示す。縦軸は、下記数式 1 により計算された値を、標準化された脱メチル化%として表す。横軸は、使用したベクターの構成及びソーティングの有無を示す。(c) システム 3+ソーティングを使用した場合における、CTCF 結合部位 (m1 ~ m4) の脱メチル化を示すグラフ。m1 ~ m4 の各々の部位における左側のバーは、ターゲット部位 2 を gRNA として使用した場合における脱メチル化を示し、右側のバーは、ターゲット部位 1 ~ 4 の gRNA を全て一緒に使用した場合における脱メチル化を示す。縦軸は、下記数式 1 により計算された値を、標準化された脱メチル化%として表す。

[図7] トランスフェクションしたベクターの構成要素を示す図 (実施例 2)。

[図8] (a) CTCF 結合部位およびマウス H19 部位を示す。CTCF 結合部位はメチル化感受性 CpG 部位 (m1 ~ m4) を有するが、実施例 2 では m2 をターゲットとして使用した。(b) システム 3+ソーティングを使用した、CTCF 結合部位における m2 のメチル化を示す。縦軸は、下記数式 2 により計算された値を、標準化されたメチル化%として表す。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

CRISPR/Cas では、DNA 切断酵素の Cas9 が、ターゲットと相補的な約 20 塩基の配列を含む短い RNA (ガイド RNA (gRNA)) と複合体を形成し、ターゲットの DNA を切断する (非特許文献 2)。ここで、dCas9 という DNA 切断活性のない変異体酵素を用いると、ターゲットを切断せずにターゲットへの結合のみを行うことができる。そこで、dCas9 に様々な構成要素を結合させることで、メチル化や脱メチル化を行う因子をリクルートすると、特定の遺伝子のメチル化制御を行うことが可能である。また dCas9 と、それと融合させたタグペプチドが複数つながったタグペプチドアレイと、タグペプチド結合部位、例えば、タグペプチドに対する一本鎖抗体 (scFv) などのタグペプチド結合部位にメチル化や脱メチル化をおこなう因子を融合させたシステムを用いると、1 つの d

Cas9に対して複数のメチル化因子や脱メチル化因子をリクルートでき、そのメチル化あるいは脱メチル化の能力を増強することができる（図3 a）。

[0012] 本発明においては、まず、メチル化または脱メチル化を所望する部位から1 kb以内のDNA配列と相補的な配列（ターゲット配列）を作製し、そして、当該ターゲット配列を含むgRNAを作製する。gRNAは、ヌクレアーゼ活性を有しないdCas9と複合体を形成する性質を有する。ここで、dCas9とタグペプチドアレイとの融合蛋白質を作製すると、gRNAはdCas9を介して当該融合蛋白質と複合体を形成するため、gRNA-dCas9-タグペプチドアレイ複合体が形成される。gRNAは、自身に含まれるターゲット配列と相補的な配列に結合するため、これによって、gRNA-dCas9-タグペプチドアレイ複合体は、メチル化または脱メチル化を所望する部位から1 kb以内のDNA配列に結合することとなる。そして、タグペプチド結合部位とメチル化酵素または脱メチル化酵素との融合蛋白質は、タグペプチド結合部位がタグペプチドアレイに結合することにより、メチル化または脱メチル化を所望する部位から1 kb以内にリクルートされる。リクルートされたメチル化酵素または脱メチル化酵素は、自身から1 kb以内にある部位をメチル化または脱メチル化する（図3 a）。

[0013] （DNAメチル化編集用キットおよびDNAメチル化編集方法）

本発明は、（1）ヌクレアーゼ活性を有しない不活性化型CRISPR-associated endonuclease Cas9（dCas9）と、GCN4などのタグペプチドがリンカーを挟んで複数つながったタグペプチドアレイとの融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA、（2）抗タグペプチド抗体などのタグペプチド結合部位と、メチル化酵素もしくは脱メチル化酵素との融合蛋白質、またはそれらをコードするRNAもしくはDNA、および（3）脱メチル化を所望する部位から1 kb以内のDNA配列と相補的な配列を含むガイドRNA（gRNA）、またはそれを発現するDNAを含む、DNAメチル化編集用キットに関する。また、本発明は、上記（1）～（3）を細胞にトランスフェクションする工程を含む、DNAメチル化編集方法に関する。

[0014] DNAメチル化編集とは、DNAの非メチル化部位をメチル化すること、およびD

NAのメチル化部位を脱メチル化することの両方を含む。

[0015] (ヌクレアーゼ活性を有しない不活性化型Cas9)

CRISPR-associated endonuclease Cas9 (Cas9) は、RECローブ (REC: recognition、認識) とNUCローブ (NUC: nuclease、ヌクレアーゼ) の2つのローブからなり、NUCローブがヌクレアーゼ活性を担う部位である (非特許文献2)。よって、本発明におけるヌクレアーゼ活性を有しない不活性化型Cas9 (dCas9) は、Cas9のNUCローブに変異を導入したものであり得る。これにより、ターゲット部位への結合能を保持したまま、Cas9のヌクレアーゼ活性を不活化させることができる。NUCローブへの変異導入部位は、ヌクレアーゼ活性のみを不活化させることができる限りにおいて制限はないが、たとえば、Cas9 (UniProtKB/Swiss-Prot: Q99ZW2) におけるAsp10のアラニンへの変異 (D10A)、His840のアラニンへの変異 (H840A)、およびAsn863のアラニンへの変異 (N863A) が好ましい。当該変異は、1種であっても、2種以上を組み合わせたものであってもよい。

[0016] dCas9をコードするDNAは、GenBank等から入手可能なCas9をコードするDNAに変異を導入することにより、作製可能である。または、市販のdCas9を含むプラスミドをAddgene等から入手して使用してもよいし、当該プラスミドを鋳型としたPCRによりdCas9をコードするDNAを得てもよいし、当業者に公知の人工遺伝子合成技術を用いて人工的に作製してもよく、その入手方法に制限はない。dCas9をコードするRNAは、公知の分子生物学的手法により入手することができ、いずれの方法を用いてもよい。たとえば、前記dCas9をコードするDNAを鋳型とし、RNAポリメラーゼを作用させることにより入手することができる。

[0017] (タグペプチドアレイ)

本発明におけるタグペプチドアレイとは、タグペプチドがリンカーを挟んで複数つながったものである。

タグペプチドは後述するタグペプチド結合部分との組み合わせで任意に選択できる。例えば、タグペプチドとタグペプチド結合部分の組み合わせとし

て、ペプチドエピトープとそれを認識する抗体の組み合わせ、スプリットタンパク質のスモールフラグメントとラージフラグメントの組み合わせなどが例示される。

ペプチドエピトープとそれを認識する抗体の組み合わせとしては、GCN4と抗GCN4抗体、Hisタグと抗Hisタグ抗体、EEヘキサペプチドと抗EEヘキサペプチド抗体、c-Mycタグと抗c-Mycタグ抗体、HAタグと抗HAタグ抗体、Sタグと抗Sタグ抗体、FLAGタグと抗FLAGタグ抗体などが例示される (Protein Engineering, Design & Selection vol. 24 no. 5 pp. 419-428, 2011)。この中ではGCN4に含まれるペプチドが好適に使用され、GCN4のアミノ酸配列は、たとえば、PDBから入手することができ、DNA配列は、GenBank等から入手可能である。また、当業者であれば、塩基配列変換ソフト等を用い、当該DNA配列情報に基づいて、それに対応するRNA配列も入手可能である。GCN4ペプチドエピトープとしては、GCN4におけるエピトープであれば制限なく使用できるが、配列番号1で表されるアミノ酸配列が好ましい。その他のタグペプチドのアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列も公知のデータベース等から情報を入手することができる。

[0018] スプリットタンパク質とはあるタンパク質を2分したときに、2分したタンパク質が再集合して元と同じ構造をつくることのできるタンパク質のペアのことをいう。特に元のタンパク質を2分するときに片方を短いペプチド（スモールフラグメント）としてタグペプチドと使用し、長い方の片割れ（ラージフラグメント）をタグペプチド結合部位として用いることができる (Current Opinion in Chemical Biology 2011, 15:789-797)。このような目的で使用できるスプリットタンパク質は公知のものを使用することができるが、例えば、GFP (Green Fluorescent Protein) が例示される。

[0019] さらに、ペプチドとタンパク質のドメインとの結合はデータベース化されており、例えばPeptide Binding Proteins Database (<http://pepbind.bicpu.edu.in/home.php>)を参照することにより、タグペプチドとタグペプチド結合部分の組み合わせを見出すことができる。例えばPDZAlpha-Syntrophin PDZ p

ことにより、作製可能である。当該DNAは、当該DNAの配列情報に基づいて、分子生物学的手法により得る方法が公知であり、たとえば、当業者に公知の人工遺伝子合成技術を用いて人工的に作製することができ、その入手方法に制限はない。また、当業者であれば、塩基配列変換ソフト等を用い、当該DNA配列情報に基づいて、それに対応するRNA配列も入手可能である。

[0024] (dCas9とタグペプチドアレイとの融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA)

dCas9とタグペプチドアレイとの融合蛋白質をコードするDNAは、周知の遺伝子操作法を含む任意の方法を用いて、上記において定義したdCas9をコードするDNAとタグペプチドアレイをコードするDNAとを結合させることにより作製することができ、特に限定されない。また、当該融合蛋白質をコードするDNAには、選択マーカーをコードするDNA配列を挿入してもよい。当該選択マーカーにより、融合蛋白質をコードするDNAが導入された細胞を、セルソーティング等により選択することが可能となる。当該選択マーカーとしては、GFP、Ds-RedおよびmCherry等の蛍光蛋白質をコードする遺伝子や、ピューロマイシン耐性遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が例示されるが、これらに限定されない。また、上記融合蛋白質またはそれをコードするRNAは、上記融合蛋白質をコードするDNAを使用して公知の分子生物学的手法により入手することができ、たとえば、上記融合蛋白質をコードするDNAを適切な発現ベクターに挿入して発現させることにより、得ることができる。

[0025] (タグペプチド結合部位)

上記の通り、タグペプチド結合部位はタグペプチドの種類に応じて抗タグペプチド（ペプチドエピトープ）抗体、スプリットタンパク質のラージフラグメントなどを使用することができる。ここで、抗タグペプチド抗体は、タグペプチドを特異的に認識する抗体を意味する。抗タグペプチド抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれ得る。当該モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体のフラグメント、F(ab')₂化抗体、F(ab')₁化抗体、短鎖抗体（scFv）、ダイアボディ（Diabodi

es) およびミニボディ (Minibodies) を含むものとする。抗タグペプチド抗体をコードするDNAは、公知の分子生物学的手法により入手可能であり、たとえば、Addgeneプラスミド60904等の市販のプラスミドからPCRにより増幅して得ることができ、または、当業者に公知の人工遺伝子合成技術を用いて人工的に作製してもよく、その入手方法に制限はない。抗タグペプチド抗体をコードするRNAは、上記抗タグペプチド抗体をコードするDNAを適切な発現ベクターに挿入して発現させることにより、得ることができる。

[0026] (メチル化酵素、脱メチル化酵素)

本発明におけるメチル化酵素としては、非メチル化部位のメチル化を触媒する酵素であれば制限なく使用することができ、DNA塩基配列上の特定の塩基をメチル化する酵素であるメチラーゼ、特定の塩基にメチル基を転移する酵素であるメチルトランスフェラーゼが含まれ、より具体的にはDNA Methyltransferase 3 beta (DNMT3B)、DNA Methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)、DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) が挙げられる。本発明における脱メチル化酵素としては、メチル化部位の脱メチル化にいたる一連の反応を触媒する酵素であれば制限なく使用することができ、Ten-eleven translocation 1 (TET1)、Ten-eleven translocation 2 (TET2)、Ten-eleven translocation 3 (TET3)、Thymine-DNA glycosylase (TDG) が含まれる。それら酵素は、酵素蛋白質の一部分であってもよいし、全体であってもよい。酵素蛋白質の一部分としては、酵素触媒部位が好ましく例示される。それら酵素をコードするDNAは、GenBank等から配列情報を入手可能であり、ヒト等の対象動物のcDNAからPCRにより作製可能である。または、それら酵素をコードするDNAは、当業者に公知の人工遺伝子合成技術を用いて人工的に作製してもよく、その入手方法に制限はない。それら酵素またはそれらをコードするRNAは、上記DNAを適切な発現ベクターに挿入して発現させることにより、得ることができる。

[0027] (タグペプチド結合部位と、メチル化酵素もしくは脱メチル化酵素との融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA)

抗ペプチドエピトープ抗体などのタグペプチド結合部位と、メチル化酵素もしくは脱メチル化酵素との融合蛋白質をコードするDNAは、周知の遺伝子操作法を含む任意の方法を用いて、上記において定義したタグペプチド結合部位をコードするDNAと、メチル化酵素または脱メチル化酵素をコードするDNAとを結合させることにより作製することができ、特に限定されない。また、当該融合蛋白質をコードするDNAには、選択マーカーをコードするDNA配列を挿入してもよい。当該選択マーカーにより、融合蛋白質をコードするDNAが導入された細胞を、セルソーティング等により選択して回収することが可能となる。当該選択マーカーとしては、GFP、Ds-RedおよびmCherry等の蛍光蛋白質をコードする遺伝子や、ピューロマイシン耐性遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が例示されるが、これらに限定されない。なお、選択マーカーをコードするDNA配列が、上記dCas9とタグペプチドアレイとの融合蛋白質をコードするDNAに挿入されている場合、当該選択マーカーとは異なる選択マーカーを、タグペプチド結合部位とメチル化酵素もしくは脱メチル化酵素との融合蛋白質をコードするDNAに挿入してもよい。また、上記融合蛋白質またはそれをコードするRNAは、上記融合蛋白質をコードするDNAを使用して公知の分子生物学的手法により入手することができ、たとえば、上記融合蛋白質をコードするDNAを適切な発現ベクターに挿入して発現させることにより、得ることができる。

[0028] (ガイドRNA (gRNA)、またはそれを発現するDNA)

本発明におけるガイドRNA (gRNA) は、CRISPER/Cas法におけるtracrRNAとcrRNAを人工的に連結させたものである。tracrRNAを発現するDNAは、非特許文献2 (第1698頁) に記載されているRNA配列を基に、公知の手法によりそれに対応するDNAを得ることが可能である。たとえば、当業者に公知の人工遺伝子合成技術を用いて、当該DNAを人工的に作製してもよく、その入手方法に制限はない。または、任意のcrRNAに対応するDNA配列を挿入することにより所望のgRNAを発現させることができるプラスミドが市販されている (Addgene プラスミド41824等) ので、それを使用してもよい。crRNAとしては、メチル

化または脱メチル化を所望する部位から 1 kb以内のDNA配列と相補的な配列を使用する。gRNAは、1 種類であってもよいし、それぞれ異なるcrRNAを含むgRNAを複数使用してもよい。

[0029] (オールインワンベクター : all in one vector)

上記で述べた2つの融合蛋白質をコードするDNAを、さらに連結させて、dCas9、タグペプチドアレイ、タグペプチド結合部位、およびメチル化酵素もしくは脱メチル化酵素の融合蛋白質をコードするDNAをベクターに組み込み、使用してもよい。当該DNAを含むベクターを、オールインワンベクターと称する。当該融合蛋白質をコードするDNAには、適宜リンカーを挿入してもよい。たとえば、dCas9とタグペプチドアレイとの融合蛋白質（構成要素1とする）と、タグペプチド結合部位とメチル化酵素もしくは脱メチル化酵素の融合蛋白質（構成要素2とする）との間に、リンカーとして、ウイルス由来の2Aペプチドを挿入すると、当該2Aペプチドが細胞内で2Aペプチターゼにより切断されるため、構成要素1と2は連結されておらず、分離した2つの蛋白質として発現することになる。また、当該オールインワンベクターには、gRNAを含めても良い。

[0030] 本発明において目的遺伝子を含むベクターとしては、真核生物細胞において複製可能なベクター、ならびにエピソームを維持するベクターあるいは宿主細胞ゲノムに組み込まれるベクターが挙げられるが、ウイルスベクターが好ましく、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターがより好ましい。ベクターは、選択マーカーを含んでもよい。「選択マーカー」とは、選択マーカーが導入された細胞に選択可能な表現型を提供する遺伝エレメントをいい、一般には、遺伝子産物が細胞の増殖を阻害するかまたは細胞を殺傷する薬剤に対する耐性を与える遺伝子である。具体的には、例えば、Ne^o遺伝子、Hy^g遺伝子、his^D遺伝子、G^pt遺伝子およびB^le遺伝子が挙げられる。選択マーカーの存在を選択するために有用な薬物としては、例えば、Ne^oに対してはG418、Hy^gに対してはハイグロマイシン、his^Dに対してはヒスチジノール、G

p t に対してはキサンチン、そして B l e に対してはブレオマイシンが挙げられる。

[0031] (細胞へのトランスフェクション)

細胞へのDNA、RNA、および蛋白質のトランスフェクションは、公知の任意の手段を使用することにより可能であり、市販のトランスフェクション用試薬を使用してもよい。たとえば、DNAのトランスフェクションには、エレクトロポレーション、Lipofectamine2000 (Invitrogen)、jetPRIME Kit (ポリプラストランスフェクション)、DreamFect (オズバイオサイエンス)、GenePorter3000 (オズバイオサイエンス)、Calcium Phosphate Transfection Kit (オズバイオサイエンス) 等を使用可能である。RNAのトランスフェクションには、エレクトロポレーション、Lipofectamine 3000 (Invitrogen)、RNAi Max (Invitrogen)、MessengerMAX (Invitrogen) 等を使用可能である。蛋白質のトランスフェクションには、エレクトロポレーション、Lipofectamine C RISRMAX (Invitrogen)、PULSin (ポリプラストランスフェクション)、Pro-DeliverIN (オズバイオサイエンス)、BioPORTER Protein Delivery Reagent (Genlantis) 等を使用可能である。細胞へのトランスフェクションは、dCas9とタグペプチドアレイとの融合蛋白質とgRNAとで予め複合体を形成させ、当該複合体を細胞にトランスフェクションしてもよい。また受精卵にマイクロインジェクション、エレクトロポレーションによりDNA、RNA、蛋白質を導入することも可能である。

実施例

[0032] 以下に非限定的な例を参照して、本発明を更に説明する。なお、本実施例ではタグペプチドとしてGCN4を使用した。これを他のタグペプチドに置き換えられることは当然のことである。

[0033] 実施例1. T E T 1 C Dを用いたターゲットの脱メチル化

<標的脱メチル基のためのプラスミド構築>

d C a s 9 - T E T 1 触媒部位 (C D) 融合蛋白質発現ベクター (p C A G - d C a s 9 T E T 1 C D) は、触媒として不活性なヌクレアーゼである

コドン最適化S. pyogenes Cas9 (dCas9) をコードする cDNA を、ヒトTET1CDのN末端にある触媒ドメインに融合することにより作製された (システム1)。dCas9フラグメントは、PCRによりAddgeneプラスミド48240から増幅された。TET1CDフラグメントはヒトcDNAからPCRにより増幅された。

[illegible]

[0035] <g RNA構築>

GfpおよびH19のための g RNAベクターは、Addgeneプラスミド41824の中にターゲットシーケンスを挿入することにより作製した。クローニングは、AflII部位の直線化と、g RNAフラグメントの挿入を媒介するギブソンアセンブリーシステムにより行った。

ターゲットシーケンスを表1に示す。

[0036] [表1]

表1: ターゲットシーケンス

ターゲット名	ターゲットシーケンス	ターゲット近辺のメチル化感受性部位
Gfap_1	ATAGACATAATGGTCAGGGG <u>TGG</u>	Gfap STAT3-binding site
Gfap_2	GGATGCCAGGATGTCAGCC <u>CGG</u>	Gfap STAT3-binding site
Gfap_3	ATATGGCAAGGGCAGCCCCG <u>TGG</u>	Gfap STAT3-binding site
II19DMR_1	GTGGGGGGCTCTTTAGGTT <u>TGG</u>	II19DMR CTCF-binding site 1
H19DMR_2	ACCCTGGTCTTTACACAA <u>AGG</u>	H19DMR CTCF-binding site 2
II19DMR_3	GAAGCTGTTATGTGCAACA <u>AGG</u>	II19DMR CTCF-binding site 3
H19DMR_4	CAGATTGGCTATAGCTAAA <u>TGG</u>	H19DMR CTCF-binding site 4

下線はPAM 配列を示す。

非関連gRNAシーケンス

ターゲット名	gRNA シーケンス
UR_1	CCATTATTGCATTAATCTGA
UR_2	TAATGCAGCCAGAAAATGAC
UR_3	TCAGGGATCAAATCTGAGC

[0037] <細胞培養>

胚性幹細胞 (ESCs) は、37℃、5%CO₂下で、1%FBS、17.5%KSR100 (10828028, Gibco)、0.2%の2-メルカプトエタノール (21985-023, Gibco)、およびESGR0 mLIF, を1x10³ ユニット/mL (ESG1107, Millipore)添加したダルベッコ改変イーグル培地—高濃度グルコース (D6429-500ML, Sigma) にて培養した。ESCsは、リポフェクトアミン2000 (Invitrogen) を添付のプロトコールに従って使用してトランスフェクションを行い、トランスフェクションから48時間後に細胞を回収し、それらを、アッセイやFACSARIAII (BD Biosciences)によるソートに、直接使用した。

[0038] <DNAメチル化解析>

ゲノムDNAは、Epitect Plus DNA Bisulfite Kit (QIAGEN)を添付の指示書に従って使用して処置された。修飾DNAは、下記表2のPCRプライマーを使用して増幅された。

[0039]

[表2]

表2 バイサルファイトシーケンスのためのPCRプライマー配列

プライマー名	プライマー配列	ターゲット近傍のメチル化感受性部位
GfapSTAT3-B3	TTGGTTAGTTTTAGGATTTTTTTT	Gfap STAT3-binding site (ES)
GfapSTAT3-B4	AAAACCTCAAACCCATCTATCTCTTC	
H19DMR-B1	AAGGAGATTATGTTTTATTTTGGGA	H19DMR CTCF-binding site 1
H19DMR-B2	AAAAAACTCAATCAATTACAATCC	
Gfap_O1B1	TTGTAAAGGTAGGATTAATAAGGGAATT	Gfap off-target site 1
Gfap_O1B2	AAAAAAAACCCCTTCAAAAAAATCTA	
Gfap_O2B1	TTATTATTATATTTGGAGGGAGGG	Gfap off-target site 2
Gfap_O2B2	ATTACACCAAAAAATTTAAAAAC	
Gfap_O3B1	TTTAAATTTTTTATGTGAATATGG	Gfap off-target site 3
Gfap_O3B2	AAACATTTAATTCATTAATACACAC	

[0040] G f a p の S T A T 3 部位、および H 1 9 の m 1 - m 4 部位における脱メチル化パーセントは、Combined Bisulfite Restriction Analysis (C O B R A) により決定された。下記表3のプライマーを使用して増幅されたフラグメントを、上記部位の中に認識部位を有する下記表3において示す制限酵素で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。

[0041] [表3]

表3 COBRAプライマーシーケンス

プライマー名	プライマー配列	制限酵素	ターゲット近傍のメチル化感受性部位
GfapSTAT3-B1	GTTGAAGATTTGGTAGTGTGAGTT	Hpy 188III	Gfap STAT3-binding site
GfapSTAT3-B2	TAAACATATAACAAAAACAACCCC		
H19DMR-B1	AAGGAGATTATGTTTTATTTTGGGA	BstUI	H19DMR CTCF-binding site 1
H19DMR-B2	AAAAAACTCAATCAATTACAATCC		
H19DMR-B3	AAGGAGATTATGTTTTATTTTGGGA	RsaI	H19DMR CTCF-binding site 2
H19DMR-B2	AAAAAACTCAATCAATTACAATCC		
H19DMR-B3	GGGTTTTTTGGTTATTGAATTTTAA	BstUI	H19DMR CTCF-binding site 3
H19DMR-B4	AATACACACATCTACCACCCCTATA		
H19DMR-B5	TTTTTGGGTAGTTTTTTTAGTTTTG	BstUI	H19DMR CTCF-binding site 4
H19DMR-B6	ACACAAATACCTAATCCCTTTATTAAC		

[0042] メチル化は、エチジウムブロマイドで染色したゲルのデンシトメトリー解析で、切断DNAの比として計算された。各々のアッセイにおいて、コントロールベクター（空のgRNAベクター）でトランスフェクトされた細胞のメチル化は、100%メチル化（0%脱メチル化）として定義され、各々のサンプルの脱メチル化は、以下の数式1を使用してコントロールによって標

準化された。

サンプル脱メチル化 (%) = (コントロールのメチル化-サンプルのメチル化) / コントロールのメチル化 × 100 …… 数式 1

[0043] 周辺領域のメチル化解析およびオフターゲット解析のために、バイサルファイトシーケンスが行われた。増幅されたフラグメントをTOPOLベクター (Invitrogen) にライゲーションし、少なくとも14クローンのシーケンスを行った。シーケンスは、QUantification tool for Methylation Analysis (QUMA)と呼ばれるメチル化解析ツールにより解析された。CpG部位における全セットのうちの2グループ間における統計的有意性は、ノンパラメトリック統計的有意性の検定に使用されるマンホイットニーUテスト (ウィルコクソンの順位和検定とも呼ばれる) を用いて評価した。

[0044] <結果>

まず、メチル化処置のために、不活性化Cas9ヌクレアーゼ (dCas9) とTET1との直接融合タンパクというシンプルな設計を作製した。TET1は、C末端に保存された触媒ドメインを有しており、このドメインはフルレングスのタンパク質よりも高い触媒活性を有する。そのため、このTET1触媒ドメイン (TET1CD) を、触媒作用が不活性であるdCas9に融合させた (図1のシステム1)。

[0045] アストロサイト特異的マーカーであるGfap遺伝子をコードするグリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP) の上流におけるSTAT3-結合部位内のシトシン残基は、ターゲットとして使用された。当該部位は、アストロサイトを除く多くの細胞タイプにおいてメチル化され、当該部位の脱メチル化は、神経前駆細胞 (NPCs) のアストロサイトへの分化において、重要な役割を有する。STAT3-結合部位周辺の3つのターゲットを設計し (図2a)、それらのためのgRNAベクターを作製して、当該gRNAベクターを、dCAS9-TET1CD融合タンパク質発現ベクター (pCAG-dCas9TET1CD) と共に、一過性に胚性幹細胞 (ESCs) に導入した。STAT3-結合部位のメチル化は、Combined Bis

ul f i t e R e s t r i c t i o n A n a l y s i s (C O B R A)により解析された。各々のアッセイにおいて、コントロールベクター（空の g R N Aベクター）と共に遺伝子導入した細胞のメチル化は、0%脱メチル化（100%メチル化）と定義され、各々のサンプルの脱メチル化は、コントロールにより標準化された。

[0046] これら3つの g R N A、G f a p 1、G f a p 2、およびG f a p 3は、S T A T 3部位において、それぞれ3%、14%、および9%の脱メチル化を示した（図2b）。一方、無関係の g R N A（U R 1、U R 2、およびU R 3）は脱メチル化を示さなかった。よって、このシンプルなシステムは g R N A依存的特異的脱メチル化を誘発するが、脱メチル化の程度はせいぜい14%であることが示された。

[0047] 次に、抗体融合T E T 1ヒドロキシラーゼ触媒ドメインの複数コピーをリクルートするために、反復ペプチド配列に融合されたd C a s 9を使用して、脱メチル化能を増幅することを試みた（図3a）。G f a p S T A T 3部位の脱メチル化のために、E S C sにおいて、G f a p 2 g R N A、G C N 4ペプチドを10コピー有するd C a s 9、およびG C N 4ペプチド抗体（s c F v）ースーパーフォルダー緑色蛍光タンパク質（s f G F P）ーT E T 1 C D融合タンパク質の発現ベクターを使用した（図1のシステム2）。しかし、このシステム2の使用により、脱メチル化の程度は改善されなかった（図4a）。

[0048] システム2により脱メチル化の程度が改善されなかった原因を探るために、19アミノ酸からなるG C N 4ペプチドエピトープの配列を分離しているリンカーの長さを検証した。もしリンカーの長さが短すぎるのであれば、抗体ーT E T 1 C D融合タンパク質にとって、G C N 4ペプチド配列に接近し結合するためのスペースが狭すぎるため、脱メチル化活性が不十分となると考えられる。もしリンカーの長さが長すぎるのであれば、抗体ーT E T 1 C D融合タンパク質はターゲットメチル化部位に近づくことができないと考えられる（図3b）。システム2のリンカーの長さは、5アミノ酸であった（

図1システム2)。

[0049] 22アミノ酸長のリンカーを有する抗体-TET1CD融合タンパク質(図1のシステム3)、および43アミノ酸長のリンカーを有するTET1CD融合タンパク質(図1のシステム4)を作製し、脱メチル化活性を比較した。合成遺伝子技術における技術的制限のために、22アミノ酸長のリンカーおよび43アミノ酸長のリンカーを有するGCN4ペプチドのコピー数は、それぞれ5および4に減少させた。GCN4ペプチドのコピー数の減少にも関わらず、22アミノ酸長のリンカーが43%と最も良い脱メチル化を示した。44アミノ酸長のリンカーは2番目に活性が高く、プロトタイプである5アミノ酸長は最も低かった(図4a)。

[0050] これらの結果は、脱メチル化活性には、GCN4のコピー数よりも、dCas9に融合する各々のGCN4ペプチドユニット配列を分離するリンカーの長さが重要であることを示唆した。リンカーの長さを5アミノ酸から22アミノ酸に拡張することにより、脱メチル化活性は顕著に改善した。これは、22アミノ酸が、抗体-TET1CD融合タンパク質がペプチド配列に近づくために十分な広さであったことによると思われる。一方、43アミノ酸のリンカー長では、抗体-TET1CD融合タンパク質がターゲットであるメチル化部位に近づくには長すぎたと思われる。

[0051] さらに脱メチル化効率を改善するために、fluorescence activated cell sorting (FACS) を使用して、GFP発現ベクター導入細胞を選択した。この目的のために、gRNA、システム3のGCN4配列を含むdCas9、および抗体-sfGFP-TET1CD融合タンパク質を含むオールインワン(all-in-one)ベクターを作製した(図1)。GFPでソートされたオールインワン導入ESCsは、ほぼ完全な脱メチル化を示した(図4)。また、期待に反して、システム3を導入しGFPでソートされたESCsもまた、ほぼ完全な脱メチル化を示した(図4)。脱メチル化能の促進とソーティング技術により、ターゲット領域における完全な脱メチル化が達成された。

[0052] 次に、ソートされたサンプルを使用して、バイサルファイトシーケンスにより、ターゲット部位からの脱メチル化の範囲を検証した。脱メチル化は、ターゲット部位から少なくとも100bp以上離れた部位でも起こっていた(図4b)。また、同じサンプルを使用して、バイサルファイトシーケンスにより、オフターゲット活性も検証したところ、顕著なオフターゲット活性は観察されなかった(図5)。

[0053] 次に、同様の実験を、父系メチル化インプリンティング遺伝子であるH19のメチル化可変領域(differential methylation region; DMR)を用いて行った。H19のDMRには、4つのメチル化感受性CTCF結合部位(m1-m4)があり、H19インプリンティングの調整に重要である(図6a)。m2をターゲットとするgRNA(H19DMR2)を、dCas9-TET1CDまたはシステム3と共にESCsに導入し、システム3導入細胞は、導入後に細胞ソーティングを行ったものも作製した。

[0054] その結果、システム3はdCas9-TET1CDと比較して、顕著なメチル化の改善が観察された。GFPでソートした細胞では、m2部位において完全な脱メチル化が観察された(図6b)。GFPでソートした細胞は、さらに周辺領域のメチル化について解析をしたところ、ターゲット領域から200bp離れたm1部位において完全な脱メチル化が示された(図6c)。一方、ターゲット部位から1kb以上離れたm3とm4部位は、わずかに脱メチル化されただけであり(図6c)、脱メチル化効果は1kb以上離れた部位にはおよばないことが示唆された。また、複数部位ターゲティングの可能性をテストするために、m1-m4のgRNAをシステム3と共に導入した(H19DMR1-4)。その結果、GFPでソートされた細胞において、4つの部位(m1-m4)全てにおいてほぼ完全な脱メチル化が観察された(図6c)。このことは、複数のgRNAを使用することにより、複数部位を脱メチル化することが可能であることが示された。

[0055] 実施例2. Dnmt3bを用いたターゲットのメチル化

ターゲットにメチル化を導入するためシステム3(リンカー22aa)を用

いてH19のm2部位のメチル化をおこなった。T E T 1 C Dの代わりに（１）Dnmt3b、（２）Dnmt3bNLS、（３）Dnmt3bNLS_N662Rを用いて実験を行った（図 7）。（１）はDe novoメチル化酵素Dnmt3bで、（２）は（１）のDnmt3bのC末にNLS（核移行シグナル）をつけたもの、（３）は（２）の662番目のアミノ酸をアスパラギン(N)からアルギニン（R）に変えたものである。このアミノ酸置換はメチル化活性を向上させることが報告されている（下記のShen L et al.）。用いたプラスミドは以下の通り。

（１）Dnmt3b: pCAG-scFvGCN4sfGFPDnmt3bF（配列番号 4 1）

（２）Dnmt3bNLS: pCAG-scFvGCN4sfGFPDnmt3bFNLS（配列番号 4 2）

（３）Dnmt3bNLS_N662R: pCAG-scFvGCN4sfGFPDnmt3bS1（配列番号 4 3）

これらの（１）～（３）の系をES細胞に導入して2日目にGFPの蛍光によりセルソーターで遺伝子が導入されて蛍光を発する細胞のみを単離し、脱メチル化のときと同様にH19のm2のメチル化を調べた。メチル化は数式 2 のようにコントロールで標準化したメチル化（％）として計算した。その結果、ターゲットのメチル化は（１）54％、（２）74％、（３）84％となり、メチル化効率はDnmt3bだけよりはNLSをつけた方がよく、さらにN662Rのアミノ酸置換をいれたものの方がよいことがわかった（図 8）。

コントロールで標準化したメチル化（％）＝（サンプルのメチル化-コントロールのメチル化）/コントロールのメチル化×100・・・数式2

参考文献

Shen L, Gao G, Zhang Y, Zhang H, Ye Z, Huang S, Huang J, Kang J. A single amino acid substitution confers enhanced methylation activity of mammalian Dnmt3b on chromatin DNA. *Nucleic Acids Res.* 38:6054-6064, 2010. doi: 10.1093/nar/gkq456.

[0056] 配列番号 1 : GCN4

配列番号 2 : リンカー 5

配列番号 3 : リンカー 2 2

配列番号 4 : リンカー 4 3

配列番号 5 : 2 A ペプチド
配列番号 6 : pCAG-dCas9TET1CD
配列番号 7 : pCAG-dCas9-10xGCN4_v4
配列番号 8 : pCAG-scFvGCN4sfGFPTET1CD
配列番号 9 : pCAG-dCas9-5xPlat2AfLD
配列番号 10 : pCAG-dCas9-3.5xSuper
配列番号 11 : pPlatTET-gRNA2
配列番号 12 : Gfap_1
配列番号 13 : Gfap_2
配列番号 14 : Gfap_3
配列番号 15 : H19DMR_1
配列番号 16 : H19DMR_2
配列番号 17 : H19DMR_3
配列番号 18 : H19DMR_4
配列番号 19 : UR_1
配列番号 20 : UR_2
配列番号 21 : UR_3
配列番号 22 : GfapSTAT3-B3
配列番号 23 : GfapSTAT3-B4
配列番号 24 : H19DMR-B1
配列番号 25 : H19DMR-B2
配列番号 26 : Gfap_01B1
配列番号 27 : Gfap_01B2
配列番号 28 : Gfap_02B1
配列番号 29 : Gfap_02B2
配列番号 30 : Gfap_03B1
配列番号 31 : Gfap_03B2
配列番号 32 : GfapSTAT3-B1

配列番号 3 3 : GfapSTAT3-B2

配列番号 3 4 : H19DMR-B3

配列番号 3 5 : H19DMR-B4

配列番号 3 6 : H19DMR-B5

配列番号 3 7 : H19DMR-B6

配列番号 3 8 : off target 1

配列番号 3 9 : off target 2

配列番号 4 0 : off target 3

配列番号 4 1 : pCAG-scFvGCN4sfGFPDnmt3bF

配列番号 4 2 : pCAG-scFvGCN4sfGFPDnmt3bFNLS

配列番号 4 3 : pCAG-scFvGCN4sfGFPDnmt3bS1

配列番号 4 4 : タグペプチドGVKESLV

配列番号 4 5 : GSリンカー

配列番号 4 6 : GSリンカー

配列番号 4 7 : GSリンカー

産業上の利用可能性

[0057] 本発明によって特定の遺伝子のメチル化を制御することができる。それにより、癌やインプリンティング疾患などDNAメチル化異常により発症する疾患（エピゲノム疾患）のモデル細胞、動物を作製することが可能である。またウイルスベクターその他のデリバリーシステムを用いれば、それらの疾患の治療に用いることが可能である。またiPS細胞作製において、Oct-4等の万能遺伝子を、本発明によって脱メチル化し活性化することにより、効果的にiPS細胞を作製することができる。

請求の範囲

- [請求項1] (1)ヌクレアーゼ活性を有しない不活性化型CRISPR-associated endonuclease Cas9 (dCas9) と、タグペプチドがリンカーを挟んで複数つながったタグペプチドアレイとの融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA、
- (2)タグペプチド結合部位と、メチル化酵素もしくは脱メチル化酵素との融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA、および
- (3)メチル化または脱メチル化を所望する部位から1 kb以内のDNA配列と相補的な配列を含むガイドRNA (gRNA)、またはそれを発現するDNAを含む、DNAメチル化編集用キット。
- [請求項2] 前記脱メチル化酵素が、Ten-eleven translocation 1の触媒部位 (TE T1CD) である、請求項1に記載のDNAメチル化編集用キット。
- [請求項3] 前記メチル化酵素が、DNA Methyltransferase 3 beta (DNMT3B)である、請求項1に記載のDNAメチル化編集用キット。
- [請求項4] 前記タグペプチドがペプチドエピトープであり、前記タグペプチド結合部位が抗ペプチドエピトープ抗体である、請求項1～3のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。
- [請求項5] 前記ペプチドエピトープがGeneral Control Non-derepressible 4 (GCN4) ペプチドエピトープであり、前記抗ペプチドエピトープ抗体が抗GCN4ペプチドエピトープ抗体である、請求項4に記載のDNAメチル化編集用キット。
- [請求項6] 前記ペプチドエピトープがHisタグまたはEEタグであり、前記抗ペプチドエピトープ抗体が抗Hisタグ抗体または抗EEタグ抗体である、請求項4に記載のDNAメチル化編集用キット。
- [請求項7] 前記抗体が一本鎖抗体 (scFv) である、請求項4～6のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。
- [請求項8] 前記タグペプチドがスプリットタンパク質のsmallフラグメントで

あり、前記タグペプチド結合部位がスプリットタンパク質のラージフラグメントである、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。

[請求項9] 前記スプリットタンパク質がGFPである、請求項 8 に記載のDNAメチル化編集用キット。

[請求項10] 前記タグペプチドがGVKESLV（配列番号 4 4）であり、前記タグペプチド結合部位がPDZ proteinである、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。

[請求項11] 前記リンカーが 5 ～ 1 0 0 アミノ酸である、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。

[請求項12] 前記リンカーが 5 ～ 5 0 アミノ酸である、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。

[請求項13] 前記リンカーが 1 0 ～ 5 0 アミノ酸である、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。

[請求項14] 前記（１）および／または（２）の融合蛋白質が、さらに選択マーカーを含む、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。

[請求項15] 前記gRNAが複数である、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。

[請求項16] 前記（１）～（３）のDNAが全て一つのベクターに含まれている、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載のDNAメチル化編集用キット。

[請求項17] 下記（１）～（３）を細胞にトランスフェクションする工程を含む、DNAメチル化編集方法。

（１）ヌクレアーゼ活性を有しない不活性化型CRISPR-associated endonuclease Cas9（dCas9）と、タグペプチドがリンカーを挟んで複数つながったタグペプチドアレイとの融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA、

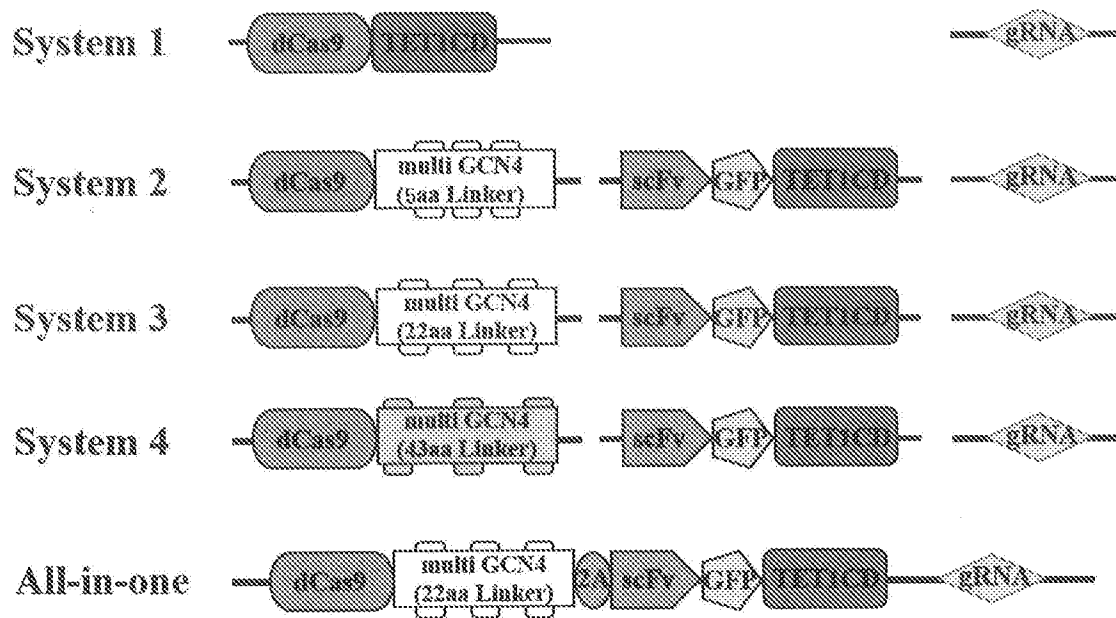
（２）タグペプチド結合部位と、メチル化酵素もしくは脱メチル化酵

素との融合蛋白質、またはそれをコードするRNAもしくはDNA、および
(3) メチル化または脱メチル化を所望する部位から 1 kb 以内の DNA
配列と相補的な配列を含むガイド RNA (gRNA)、またはそれを発現す
る DNA。

[請求項 18] 前記 (1) および／または (2) の融合蛋白質が、さらに選択マー
カーを含む、請求項 17 に記載の DNA メチル化編集方法。

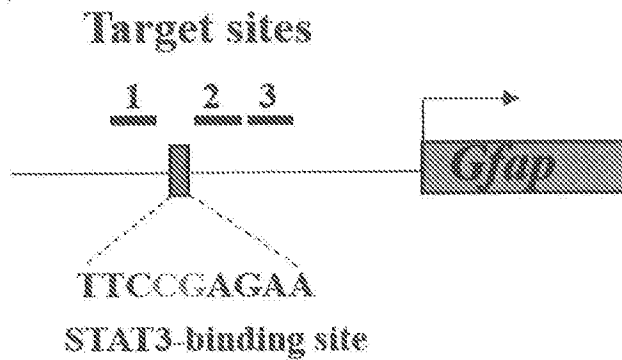
[請求項 19] 前記選択マーカを発現する細胞を選択して回収する工程をさらに含
む、請求項 18 に記載の DNA メチル化編集方法。

[図1]

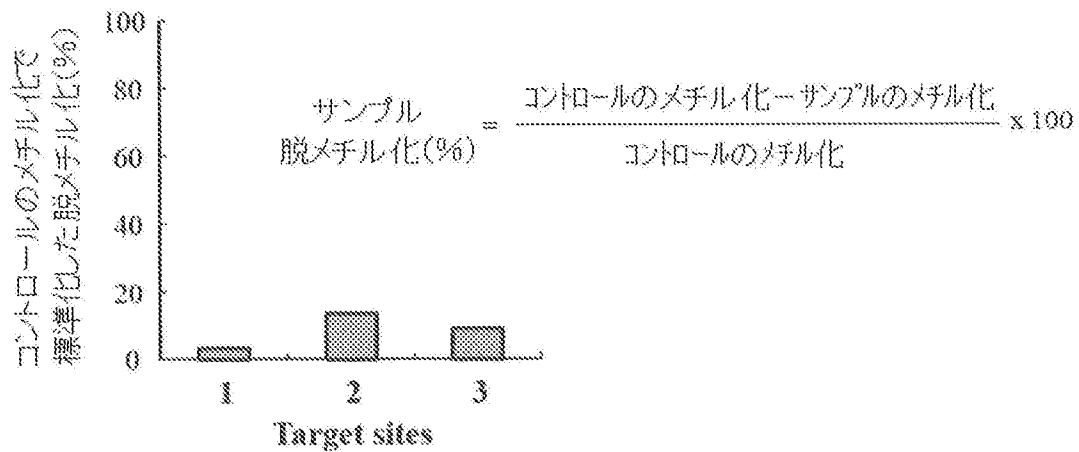


[図2]

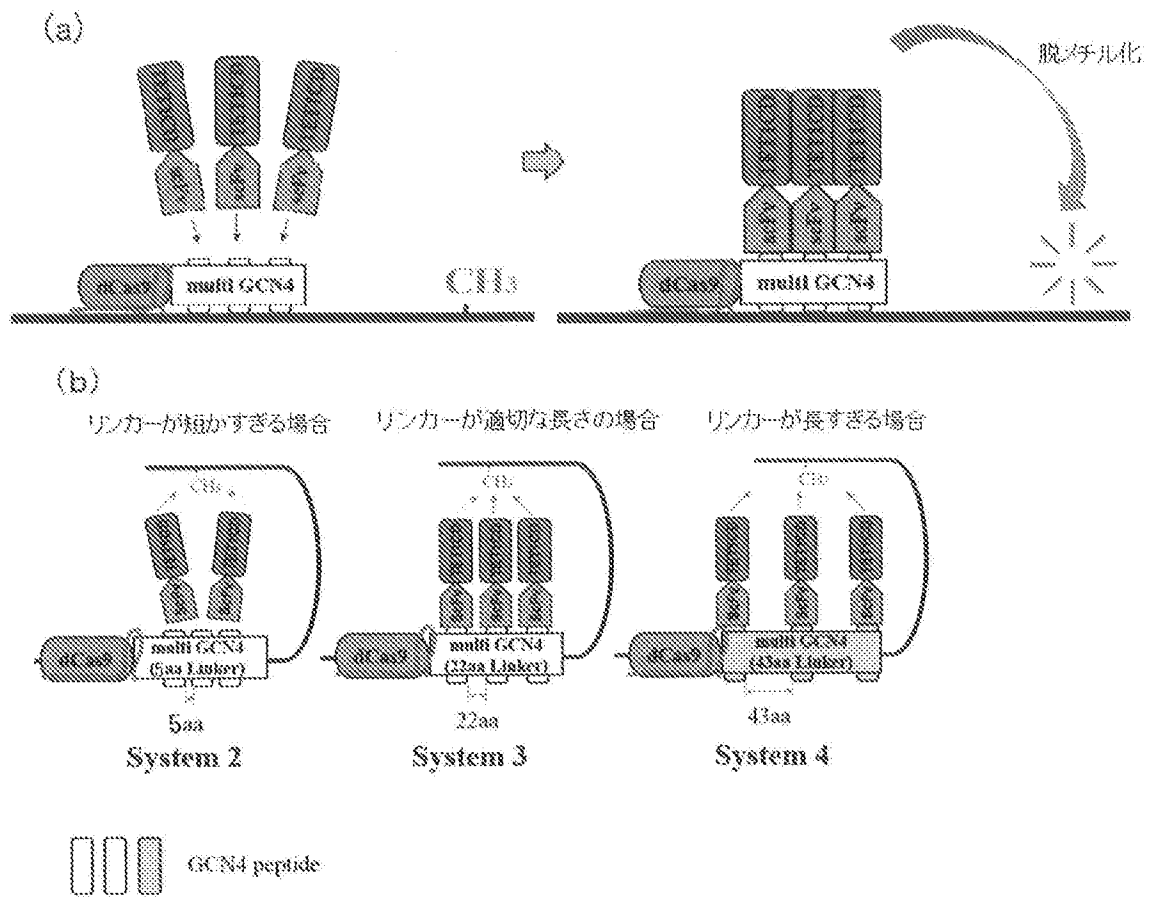
(a)



(b)

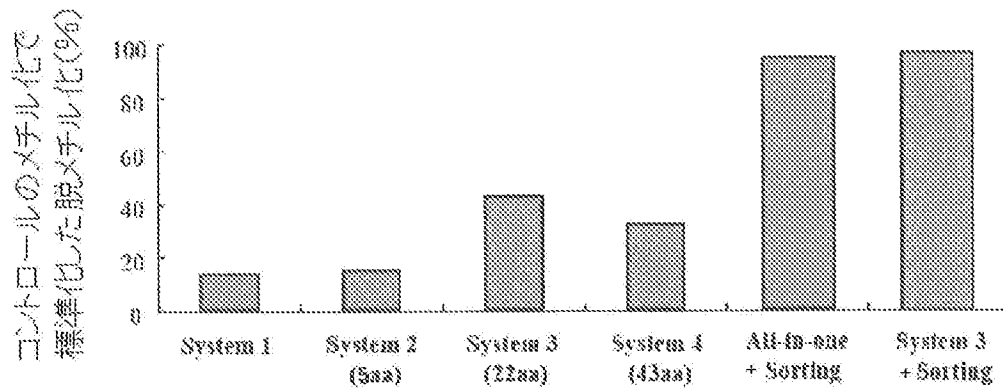


[図3]

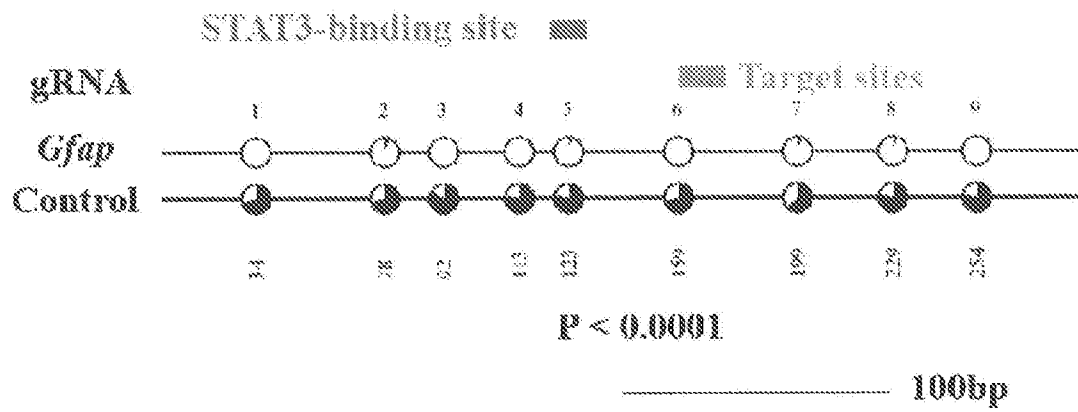


[図4]

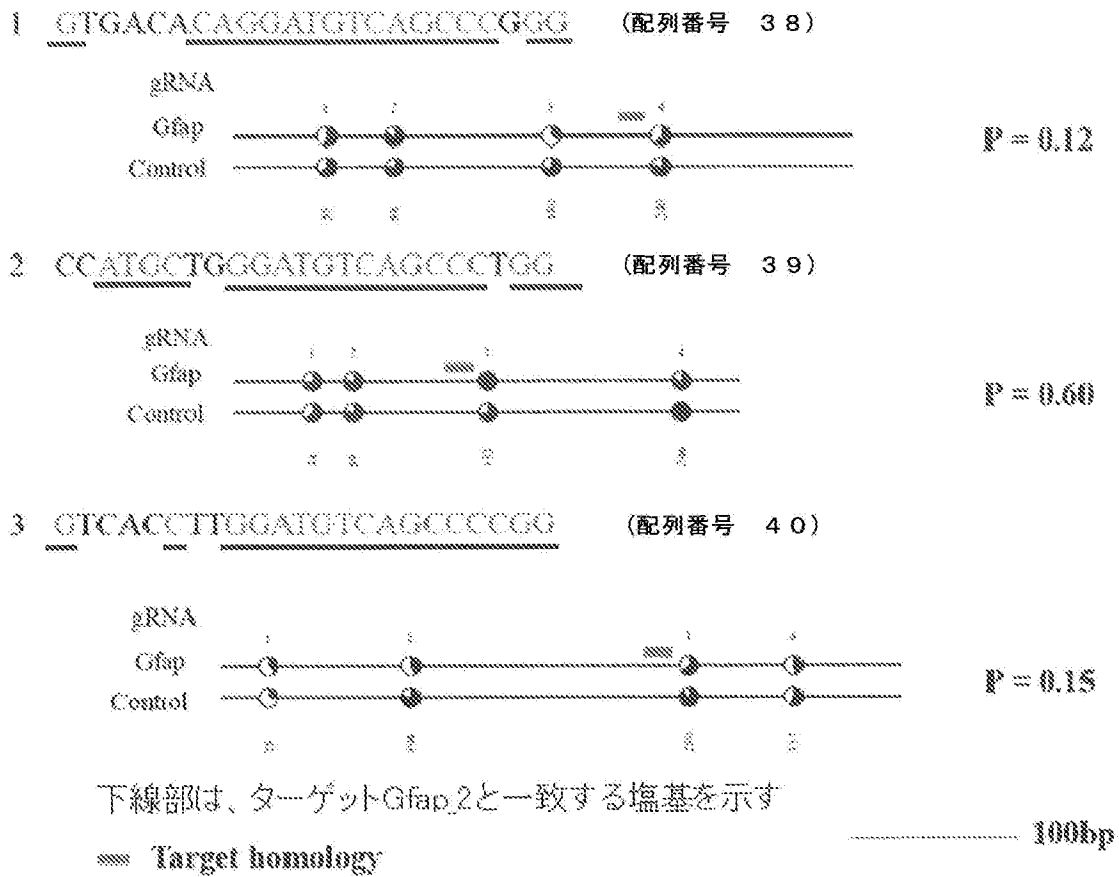
(a)



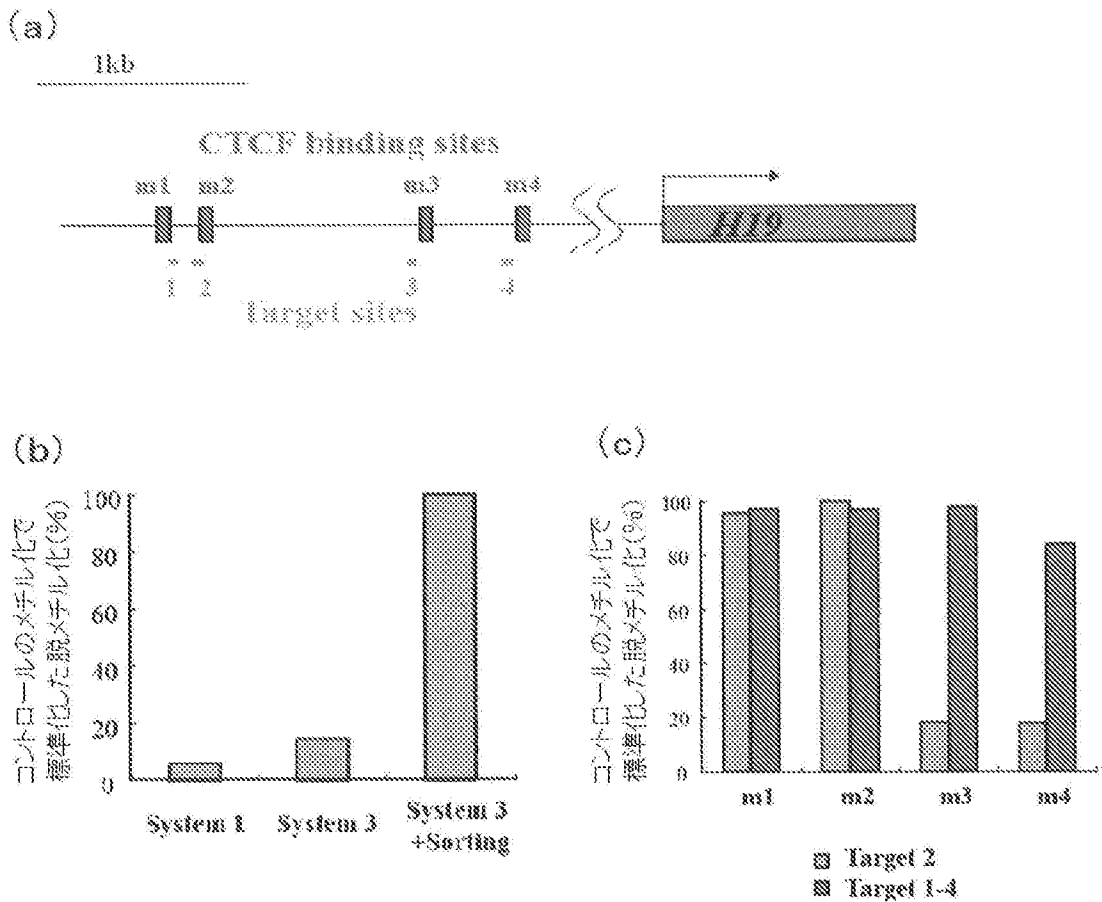
(b)



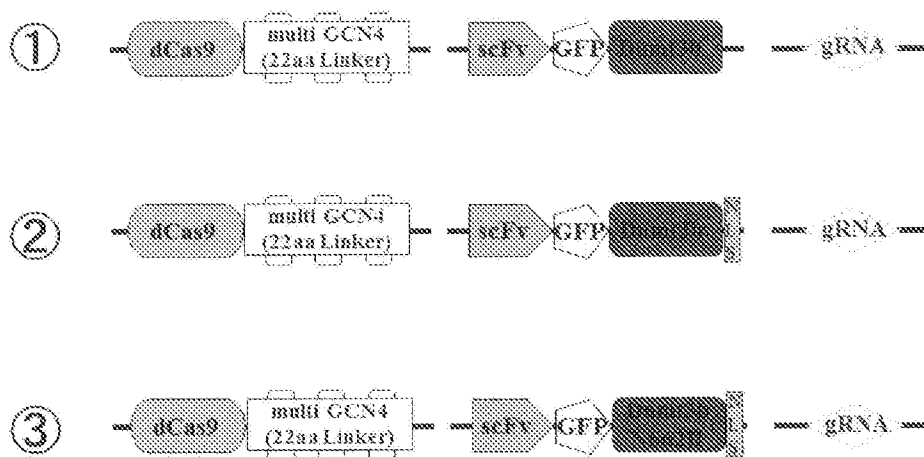
[図5]



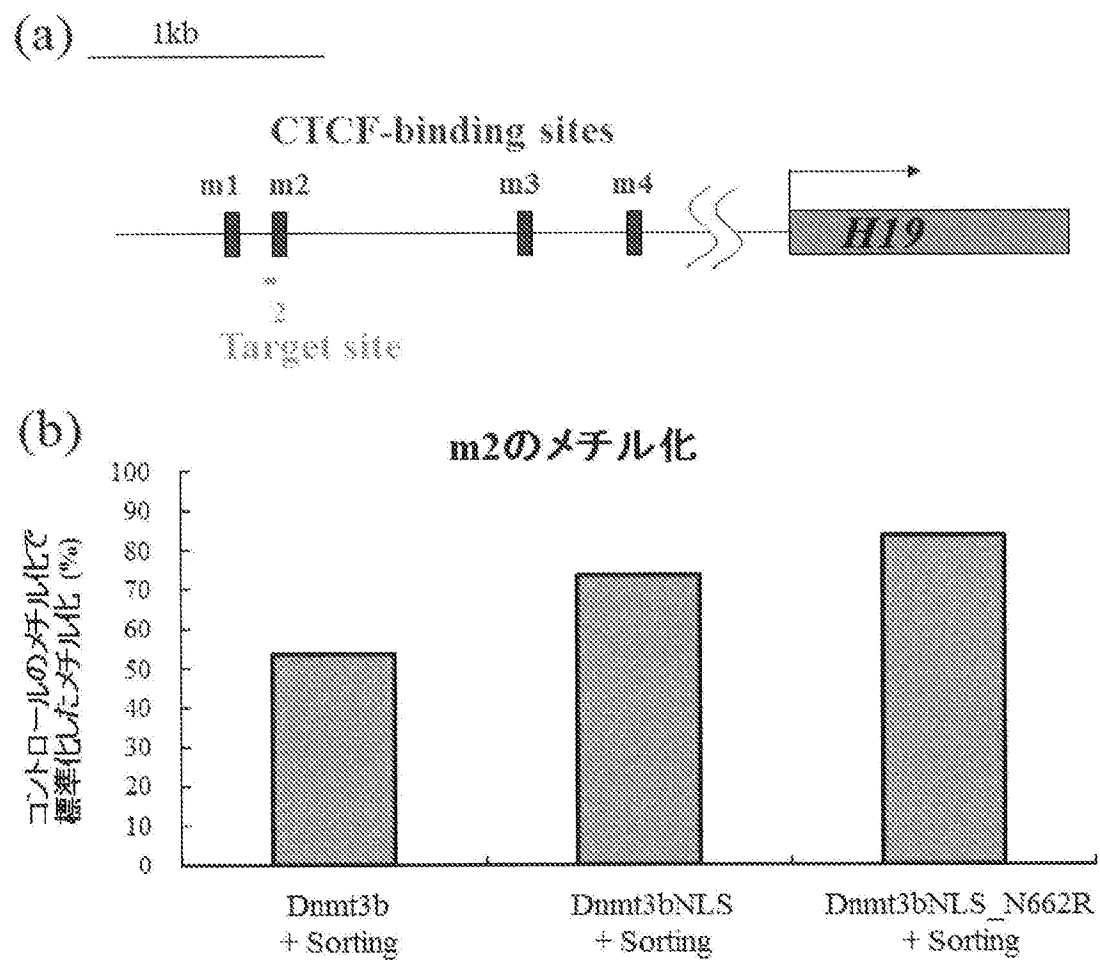
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/084958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)i

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)

C12N15/09, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/10

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TANENBAUM E. M. et al., A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging, Cell, 2014, Vol.159, pp.635-646	1-19
Y	MAEDER M. L. et al., Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins, Nature Biotechnology, 2013, Vol.31, No.12, pp.1137-1142	1-19
Y	MALI P. et al., Cas9 as a versatile tool for engineering biology, Nature Methods, Vol.10, No.10, 2013, pp.957-963	1-19

☒ 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 January 2017 (16.01.17)

Date of mailing of the international search report
31 January 2017 (31.01.17)

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

International application No.

PCT/JP2016/084958

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Taiga YAMAZAKI et al., "Genome Henshu Gijutsu o Oyo shita Pericentromere eno Jin'iteki·Hairetsu Tokuteki DNA Methyl-ka Yudo", BMB2015 Koen Yoshishu, 06 November 2015 (06.11.2015), vol.2015th, #1P0832	1-19
Y	WO 2014/152432 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 25 September 2014 (25.09.2014), claims 7 to 9, 24; page 22, lines 17 to 18 & US 2014/0295556 A1 & US 2014/0295557 A1 & EP 2970986 A2 & KR 10-2015-0131250 A & CN 105408483 A	1-19
Y	SHEN L. et al., A single amino acid substitution confers enhanced methylation activity of mammalian Dnmt3b on chromatin DNA, Nucleic Acids Research, 2010, Vol.38, No.18, pp.6054-6064	3-19
Y	CABANTOUS S. et al., A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association, Scientific Reports, 2013, Vol.3, pp.2854/1-2854/9	8-9
Y	SKELTON N. J. et al., Origins of PDZ domain ligand specificity, The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol.278, No.9, pp.7645-7654	10
P,X/P,Y	MORITA S. et al., Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions, Nature Biotechnology, 2016.10, Vol.34, No.10, pp.1060-1065, Epub: 29 AUG 2016	1-2,4-7, 11-19/3,8-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)i

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. C12N15/09, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/10

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), DWPI (Thomson Innovation)

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	TANENBAUM E. M. et al., A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging, Cell, 2014, Vol.159, pp.635-646	1-19
Y	MAEDER M. L. et al., Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins, Nature Biotechnology, 2013, Vol.31, No.12, pp.1137-1142	1-19

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

16.01.2017

国際調査報告の発送日

31.01.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤井 美穂

4 N

4434

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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 請求項の番号
Y	MALI P. et al., Cas9 as a versatile tool for engineering biology, Nature Methods, Vol.10, No.10, 2013, pp.957-963	1-19
Y	山崎大賀 他, ゲノム編集技術を応用したペリセントロメアへの人為的・配列得的DNAメチル化誘導, BMB2015 講演要旨集, 2015.11.06, Vol.2015th, #1P0832	1-19
Y	WO 2014/152432 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2014.09.25, Claims 7-9, 24, p.22 1.17-18 & US 2014/0295556 A1 & US 2014/0295557 A1 & EP 2970986 A2 & KR 10-2015-0131250 A & CN 105408483 A	1-19
Y	SHEN L. et al., A single amino acid substitution confers enhanced methylation activity of mammalian Dnmt3b on chromatin DNA, Nucleic Acids Research, 2010, Vol.38, No.18, pp.6054-6064	3-19
Y	CABANTOUS S. et al., A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association, Scientific Reports, 2013, Vol.3, pp.2854/1-2854/9	8-9
Y	SKELTON N. J. et al., Origins of PDZ domain ligand specificity, The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol.278, No.9, pp.7645-7654	10
P, X / P, Y	MORITA S. et al., Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions, Nature Biotechnology, 2016.10, Vol.34, No.10, pp.1060-1065, Epub: 29 AUG 2016	1-2, 4-7, 11-19 /3, 8-10