

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(WO2017/090724)	
学内発明者	畑田 出穂(生体調節研究所) 森田 純代(生体調節研究所) 堀居 拓郎(生体調節研究所)	
技術分野	医療、疾患モデル動物	IP27-016
発明の概要	特定遺伝子のメチル化制御は、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。本発明者らは、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た。	
説明図	<p>(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1kb 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。</p>	
ポイント	本発明により、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。	

発明の名称	条件付きノックアウト動物の製造方法 (PCT/JP2017/046837)														
学内発明者	畑田 出穂(生体調節研究所) 堀居 拓郎(生体調節研究所)														
技術分野	疾患モデル動物作製	IP28-024													
発明の概要	ノックアウトしたい遺伝子のエクソン(タンパク質をコードする領域)の両端のイントロン部分(タンパク質をコードしない領域)にそれぞれ loxP という 34 塩基からなる配列を同方向に配置されるように挿入する。エクソンが2つの loxP に挟まれた状態を Flox (Flanked loxP) という。本発明では2つの loxP を2ステップに分けて染色体に導入することにより、従来の2つの loxP を1ステップで導入する方法に比べ高い効率で Flox 動物を得る。														
説明図	<p>MeCP2遺伝子 Flox効率 (Flox数/胚盤胞数)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>導入方法</th> <th>ステップ</th> <th>Flox効率 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">エレクトロポレーション</td> <td>1-step</td> <td>~8%</td> </tr> <tr> <td>2-step</td> <td>~23%</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">インジェクション</td> <td>1-step</td> <td>~5%</td> </tr> <tr> <td>2-step</td> <td>~8%</td> </tr> </tbody> </table>	導入方法	ステップ	Flox効率 (%)	エレクトロポレーション	1-step	~8%	2-step	~23%	インジェクション	1-step	~5%	2-step	~8%	<p>【左図】 マウス胚盤胞期胚における MeCP2 遺伝子での Flox 効率 (Flox 数/胚盤胞数) のデータを示す。エクストロポレーション: 電気融合して数倍になった胚を取り除く方法 インジェクション: マイクロマニピレータを用いて受精卵に注入する方法 いずれの方法でも2ステップの方が1ステップより Flox 効率が高い。</p>
導入方法	ステップ	Flox効率 (%)													
エレクトロポレーション	1-step	~8%													
	2-step	~23%													
インジェクション	1-step	~5%													
	2-step	~8%													
ポイント	loxP 等のリコンビナーゼ認識配列を染色体上の標的部位の両端に異なるタイミングで導入することにより、Flox 動物の形質転換動物等の染色体上にリコンビナーゼ認識配列のペアを有する条件付きノックアウト動物を効率的に製造する。														