

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6130923号  
(P6130923)

(45) 発行日 平成29年5月17日 (2017. 5. 17)

(24) 登録日 平成29年4月21日 (2017. 4. 21)

|                          |                       |
|--------------------------|-----------------------|
| (51) Int. Cl.            | F I                   |
| C 1 2 N 15/09 (2006. 01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| C 1 2 N 5/10 (2006. 01)  | C 1 2 N 5/10          |
| C 1 2 N 1/21 (2006. 01)  | C 1 2 N 1/21          |
| C 1 2 N 1/15 (2006. 01)  | C 1 2 N 1/15          |
| C 1 2 N 1/19 (2006. 01)  | C 1 2 N 1/19          |

請求項の数 35 (全 60 頁) 最終頁に続く

|               |                               |           |                      |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2015-540898 (P2015-540898)  | (73) 特許権者 | 507044516            |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年11月6日 (2013. 11. 6)      |           | プレジデント アンド フェローズ オブ  |
| (65) 公表番号     | 特表2015-533297 (P2015-533297A) |           | ハーバード カレッジ           |
| (43) 公表日      | 平成27年11月24日 (2015. 11. 24)    |           | アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2013/068818             |           | 1 3 8, ケンブリッジ, クインシー |
| (87) 国際公開番号   | W02014/074648                 |           | ストリート 1 7            |
| (87) 国際公開日    | 平成26年5月15日 (2014. 5. 15)      | (73) 特許権者 | 510077440            |
| 審査請求日         | 平成28年11月4日 (2016. 11. 4)      |           | トラスティーズ オブ ボストン ユニバ  |
| (31) 優先権主張番号  | 61/843, 934                   |           | ーシティー                |
| (32) 優先日      | 平成25年7月9日 (2013. 7. 9)        |           | アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 2 1 5, ボストン, ワン シルバー |
| (31) 優先権主張番号  | 61/722, 825                   |           | ウェイ                  |
| (32) 優先日      | 平成24年11月6日 (2012. 11. 6)      | (74) 代理人  | 100079108            |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 弁理士 稲葉 良幸            |
| 早期審査対象出願      |                               |           | 最終頁に続く               |

(54) 【発明の名称】 リボレギュレーター組成物および使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5' から 3' の順で、

(1) 一本鎖トーホールドドメインと、

(2) (i) 開始コドンと、

(i i) リボソーム結合部位を含むループドメインと、

を含む完全または部分二本鎖ステムドメインと、

(3) コードドメインと

を含む RNA

を含むトーホールドリボレギュレーター。

【請求項 2】

スパーサードメインをさらに含む、請求項 1 に記載のリボレギュレーター。

【請求項 3】

前記スパーサードメインが、9～33ヌクレオチド長である、請求項 2 に記載のリボレギュレーター。

【請求項 4】

前記スパーサードメインが、21ヌクレオチド長である、請求項 2 に記載のリボレギュレーター。

【請求項 5】

前記スパーサードメインが、前記ステムドメインと前記コードドメインとの間に位置し

ている、請求項 2 ～ 4 のいずれか一項に記載のリボレギュレーター。

【請求項 6】

前記ステムドメインが、前記開始コドンの上流（5'）および／または下流（3'）配列を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のリボレギュレーター。

【請求項 7】

前記開始コドンの前記上流配列が、6ヌクレオチドである、請求項6に記載のリボレギュレーター。

【請求項 8】

前記開始コドンの前記下流配列が、9ヌクレオチドである、請求項6または7に記載のリボレギュレーター。

10

【請求項 9】

前記開始コドンの前記下流配列が、ストップコドンを含み、請求項6～8のいずれか一項に記載のリボレギュレーター。

【請求項 10】

前記コードドメインが、レポータータンパク質をコードする、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のリボレギュレーター。

【請求項 11】

前記レポータータンパク質が、緑色蛍光タンパク質（GFP）である、請求項10に記載のリボレギュレーター。

【請求項 12】

20

前記コードドメインが、非レポータータンパク質をコードする、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のリボレギュレーター。

【請求項 13】

前記トーホールドドメインが、天然存在RNAに配列において相補的である、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載のリボレギュレーター。

【請求項 14】

前記トーホールドドメインが、非天然存在RNAに配列において相補的である、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載のリボレギュレーター。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載のリボレギュレーターのトーホールドドメインにハイブリダイズし、二次構造を含まないか、または最小の二次構造を含む第1のドメインと、

30

請求項 1 に記載のリボレギュレーターのステムドメイン中の配列にハイブリダイズする第2のドメインとを含むトランス活性化RNA（taRNA）。

【請求項 16】

前記第1のドメインが、前記トーホールドドメインに100%相補的である、請求項15に記載のトランス活性化RNA。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載のリボレギュレーターと、  
請求項15または16に記載のトランス活性化RNA（taRNA）とを含むシステム。

40

【請求項 18】

細胞である、請求項17に記載のシステム。

【請求項 19】

前記細胞が、原核細胞である、請求項18に記載のシステム。

【請求項 20】

無細胞インビトロシステムである、請求項17に記載のシステム。

【請求項 21】

前記リボレギュレーターおよび前記 taRNA が、互いにハイブリダイズする、請求項

50

17～20のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項22】

リボレギュレーターとt a R N Aとの比が、1未満、0.5未満、または0.1未満である、請求項17～21のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項23】

前記リボレギュレーターが、第1の核酸中にコードされ、前記t a R N Aが、第2の核酸中にコードされる、請求項17～22のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項24】

前記第1の核酸が、第1のプラスミドであり、前記第2の核酸が、第2のプラスミドである、請求項23に記載のシステム。

【請求項25】

前記リボレギュレーターが、第1の核酸中に含まれ、前記t a R N Aが、第2の核酸中に含まれる、請求項18～22のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項26】

前記第1のプラスミドが、中コピー複製起点を含み、前記第2のプラスミドが、高コピー複製起点を含む、請求項24に記載のシステム。

【請求項27】

請求項1～15のいずれか一項に記載のリボレギュレーターを含む核酸。

【請求項28】

請求項27に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項29】

請求項16または17に記載のトランス活性化RNA (t a R N A) を含む核酸。

【請求項30】

請求項29に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項31】

試料中のRNAの存在を検出する方法であって、  
請求項1に記載のリボレギュレーターと試料とを、内因性RNAの存在下で前記コードドメインの翻訳を可能とするが、前記内因性RNAの不存在下で可能としない条件下で合わせることで、ここで、前記リボレギュレーターは、内因性RNAに相補的なトーホールドドメインを含み、前記リボレギュレーターは、レポータータンパク質をコードするコードドメインを含む；そして

前記レポータータンパク質を前記内因性RNAの指標として検出すること、を含む方法。

【請求項32】

細胞中のRNAの存在を検出する方法であって、

細胞中に請求項1に記載のリボレギュレーターを導入すること、ここで、前記リボレギュレーターは、前記細胞中の内因性RNAに相補的なトーホールドドメインを含み、前記リボレギュレーターは、レポータータンパク質をコードするコードドメインを含む；そして

前記レポータータンパク質を前記内因性RNAの指標として検出すること、を含む方法。

【請求項33】

前記レポータータンパク質が、緑色蛍光タンパク質 (G F P) である、請求項31または32に記載の方法。

【請求項34】

レポータータンパク質の量が、内因性RNAの量の指標である、請求項31～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

タンパク質翻訳を制御する方法であって、  
請求項1に記載のリボレギュレーターと請求項16に記載のt a R N Aとを、前記t a R

10

20

30

40

50

NAの存在下で前記コードドメインの翻訳を可能とするが、前記 t a RNA の不存在下で可能としない条件下で合わせることを含み、前記リボレギュレーターは、前記 t a RNA に相補的なトーホールドドメインを含み、前記リボレギュレーターは、非レポータータンパク質をコードするコードドメインを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府による資金提供を受けた研究

本発明は、DARPAにより授与された助成金番号635-67116-XXXX-167832-435548-0002、66625および米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)により授与された助成金番号1DP2OD007292のもと、米国政府の資金提供を受けて行われた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

10

【0002】

関連出願

本出願は、2012年11月6日に出願された米国仮特許出願第61/722825号および2013年7月9日に出願された米国仮特許出願第61/843934号の利益を主張し、それぞれの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

20

発明の背景

リボレギュレーターは、核酸配列に応答して細胞の変化をもたらすRNAの配列である。典型的には、タンパク質翻訳を調節し、またはmRNA分解をトリガーするこれらのRNAベースデバイスは、合成生物学における多数の用途、例として、遺伝子発現の感受性制御、様々な代謝経路を通しての代謝フラックスの分流、および細胞死の合成制御に使用されている。

【0004】

遺伝子発現を制御するリボレギュレーターにおいて、タンパク質翻訳の抑制は、目的遺伝子(GOI)の上流に存在する二本鎖RNA領域内の正常一本鎖リボソーム結合部位(RBS)の封鎖に依存する。したがって、RBSがGOIの上流のヘアピン内で封鎖されるmRNAは、シス抑制RNA(crRNA)である。トランス活性化RNA(taRNA)がcrRNAに結合し、抑制RNA二本鎖を巻き戻し、それにより目下一本鎖RBSを露出させ、下流遺伝子の翻訳を活性化し、エンジニアリング型crRNAをベースとするリボレギュレーターを構築することができる。GOIの発現を減少させるリボレギュレーターにおいて、RBSおよびGOIの開始コドンは、トリガーRNAの不存在下で両方露出される。しかしながら、RBSに対するアンチセンスおよびスタートコドンを担持するトランス抑制RNA(trRNA)は、リボレギュレーターに結合し、下流遺伝子の翻訳を強力に抑制し得る。

30

【0005】

過去10年にわたり、研究者らは、原核細胞中で遺伝子発現を制御するための多数の異なるリボレギュレーターシステムを開発してきた。これらの従来のシステムは、多数の反復設計モチーフを利用している。リボレギュレーターの大部分は、crRNA/トランスRNAハイブリダイゼーション反応を推進するためにループ-直鎖相互作用を用いている。これらの相互作用において、一方の鎖中の直鎖一本鎖領域は、他方の鎖中の二本鎖の末端において樹立されたループに結合する。この相互作用における本質はキッシングループ構造の形成であり、その構造においてRNA配列の三次構造がループ内の塩基の外側へのフリッピングを引き起こし、直鎖RNA鎖との結合を促進する。重要なことに、このキッシングループ構造は、ループ領域内部の特定の配列についてのみ樹立され、考えられるcrRNA設計の数を厳しく限定し得る。

40

【0006】

50

全ての従来のリボレギュレーターシステムは、G O I の翻訳を妨げるためのR B S の封鎖に依存している。この設計選択は、2つの重要な意味を有する。第1に、合成生物学における遺伝子回路の最適化における作業のほとんどは、細胞内部のタンパク質レベルを細かく調整するためのR B S の強度の変動に依存する。R B S 配列がこれらのリボレギュレーターの機能的部分であるため、リボレギュレーターR B S をバリエーションにより単純に置き換え、新たなR B S の強度に従って予測可能な様式で変動するデバイスの出力特性を予測することができない。さらに、R B S の変化は、トランスRNAの配列中の対応する改変を要求する。第2に、遺伝子発現を活性化するリボレギュレーターについて、R B S を封鎖するリボレギュレーターは、c r RNA R B S 配列に少なくとも部分的に相補的なt a RNA配列により活性化しなければならない。結果的に、未結合t a RNAは、リボソーム結合について脱抑制c r RNA種と競合し得る。あるいは、t a RNA内のR B S 配列は、ステム領域内で封鎖され得る。この追加の二次構造は、c r RNAとの結合のキネティクスおよびリボレギュレーターのダイナミックレンジを減少させ得る。

10

**【発明の概要】****【課題を解決するための手段】****【0007】****発明の概要**

本発明は、部分的には、RNA、例として内因性RNAにより活性化することができるプログラブルリボレギュレーターを目的細胞または試料に提供する。このようなプログラブルリボレギュレーターは、従来、部分的には、厳しい制約、例として、本明細書に概説される配列制約に起因して考えられなかった。本発明の新規リボレギュレーターは、例えば、RNA、例えば、限定されるものではないが、内因性RNAによる活性化を可能とするための、t a RNA（トリガーRNA）（およびt a RNAがハイブリダイズするc r RNAの対応する領域（例えば、スイッチRNA））の配列における十分な自由を提供する。タンパク質レポーター、例えば、蛍光レポーターに結合している場合、そのようなリボレギュレーターは、生細胞または他のタイプのRNA含有試料中のRNAレベルをリアルタイムで調査するためのセンサーとして作用する。本発明は、RNAを細胞（または試料）から回収する必要なく内因性RNAをリアルタイムで検出および定量するために使用することができる。本方法は、生理学的コピー数において存在するRNAを検出するために十分に感受性である。

20

30

**【0008】**

本発明のリボレギュレーターは、先行技術よりも配列の制約を受けず、したがって、種々のリボレギュレーターを生成し、重要なことに、単一のシステム、例えば、細胞中で一緒に使用することができる。このようなオルソゴナル性は、先行技術のリボレギュレーターを使用する場合、これまで考えられなかった。本発明のリボレギュレーターは、その構造についてR B S に依存もしない。結果として、リボレギュレーターの機能に影響を与えずにR B S を改変することが可能である。本発明のリボレギュレーターのプログラブルな性質は、高次細胞論理の「プラグアンドプレイ」実装を可能とする。

**【0009】**

したがって、本発明は、本発明のリボレギュレーター（例として、トーホールドスイッチRNAおよび／またはトーホールドリプレッサー）および／またはt a RNA（トリガーRNA）および／またはシンク（sink）RNA組成物を使用して1つ以上の内因性RNAを検出（センシング）し、そのレベルを計測し、細胞または試料中で1つ以上のタンパク質の感受性制御（例として、翻訳制御）を同時に行い、細胞または試料中で複合論理演算を実施し、細胞または試料中でプログラミングし、生物システム中の単一ヌクレオチド多型（SNP）を検出し、インビトロ翻訳システム中のRNAおよびSNP RNAを検出する方法を提供する。

40

**【0010】**

本発明のシス抑制RNA（c r RNA）およびトランス活性化RNA（t a RNA）は、全部または一部がRNAからなっていてよい。これらは、天然存在ヌクレオチドおよび

50

／または非天然存在ヌクレオチドを含み得る。c r R N Aは、本明細書において、スイッチR N Aと称することもできる。c r R N Aは、典型的には、t a R N A（またはトリガーR N A）に結合するまで抑制されるR N Aを意図し、したがって結合はc r R N A／スイッチR N Aからの目的タンパク質の翻訳をもたらす。c r R N A／スイッチへのトリガーR N Aの結合は、典型的には、一部の場合、および本明細書においてより詳細に記載のとおりトーホールドドメインを介して生じる。

#### 【0011】

本発明は、コードドメインへの作動可能な結合を介してモジュラーとして使用することができるc r R N Aを企図する。本発明は、c r R N Aを脱抑制または活性化するためにモジュラーとして使用することができるt a R N Aをさらに企図する。

10

#### 【0012】

したがって、一態様において、本発明は、一本鎖トーホールドドメインと、開始コドンを含む完全または部分二本鎖ステムドメインと、リボソーム結合部位を含むループドメインとを含むトーホールドc r R N A（トーホールドスイッチ）リボレギュレーターを提供する。トーホールドc r R N A／トーホールドスイッチは、ループドメイン中に局在するR B S配列を含み得る。

#### 【0013】

別の態様において、本発明は、複数のc r R N Aを同一のまたは異なるt a R N A（トリガーR N A）により活性化することができる、コードドメインに（下記のとおり）場合により作動可能に結合している2つ以上のc r R N Aを含むR N Aを提供する。一部の実施形態において、単一のt a R N Aは、下流コード配列の発現を活性化し得る。このような実施形態において、トーホールドc r R N Aリボレギュレーターは、単一のリードアウトを使用して複数のt a R N Aの発現を検出するために使用することができる。

20

#### 【0014】

別の態様において、本発明は、（1）一本鎖トーホールドドメインと、開始コドンを含む完全または部分二本鎖ステムドメインと、リボソーム結合部位を含むループドメインとを含むc r R N Aリボレギュレーターと、（2）コードドメインとを含むトーホールドリボレギュレーターシステムを提供する。一部の実施形態において、ステムドメイン中の相補的領域にハイブリダイズするt a R N Aは、下流コード配列の発現を活性化する。一部の実施形態において、t a R N Aの2、3、4、5、6つ以上または全てが、下流コード配列の発現を活性化するために要求される。システムおよびデバイスという用語は、本明細書において、リボレギュレーターコンポーネント、例として、限定されるものではなく、任意の組合せにおいて、c r R N A（スイッチR N A）、t a R N A（トリガーR N A）、シンクR N Aなどの集合体を指すために互換的に使用される。

30

#### 【0015】

一部の実施形態において、リボレギュレーターは、スペーサードメインをさらに含む。一部の実施形態において、スペーサードメインは、低分子量アミノ酸をコードする。一部の実施形態において、スペーサードメインは、約9～33ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、スペーサードメインは、約21ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、スペーサードメインは、ステムドメインとコードドメインとの間に位置している。一部の実施形態において、スペーサードメインは、33ヌクレオチド長超であり、一本鎖および二本鎖領域、例として、他のリボレギュレーターを含有し得る。

40

#### 【0016】

一部の実施形態において、ステムドメインは、開始コドンの上流（5'）および／または下流（3'）配列を含む。一部の実施形態において、開始コドンの上流配列は、約6ヌクレオチドである。一部の実施形態において、開始コドンの下流配列は、約9ヌクレオチドである。一部の実施形態において、開始コドンの下流配列は、ストップコドンをコードしない。

#### 【0017】

一部の実施形態において、コードドメインは、レポータータンパク質をコードする。一

50

部の実施形態において、レポータータンパク質は、緑色蛍光タンパク質（GFP）である。一部の実施形態において、コードドメインは、非レポータータンパク質をコードする。本明細書において使用される非レポータータンパク質は、レポータータンパク質に加えて、またはそれに代える形で使用され、または機能する任意のタンパク質である。非レポータータンパク質は、細胞または試料中で別の実体と相互作用し得、それにより細胞もしくは試料または別の実体の変化をもたらす得る。

#### 【0018】

一部の実施形態において、トーホールドドメインは、天然存在RNAに配列において相補的である。天然存在RNAは、目的細胞から（例えば、内因性遺伝子座から）発現され得るRNAであり得る。一部の実施形態において、トーホールドドメインは、非天然存在RNAに配列において相補的である。非天然存在RNAは、目的細胞中で天然に発現されず（例えば、それは内因性遺伝子座から発現されない）、代わりに目的細胞中に導入された外因性核酸から発現させることができるRNAであり得る。

#### 【0019】

別の態様において、本発明は、前記リボレギュレーターのいずれかのトーホールドドメインにハイブリダイズし、二次構造を含まず、または最小の二次構造を含む第1のドメインと、トーホールドドメインの下流（3'）配列にハイブリダイズする第2のドメインを含むトランス活性化RNA（taRNA）を提供する。一部の実施形態において、第1のドメインは、トーホールドドメインに100%相補的である。一部の実施形態において、第2のドメインは、トーホールドドメインの下流配列に100%未満で相補的であり得る。

#### 【0020】

taRNAは、2つ以上のRNAの鎖からなっていてよく、組合せにおけるそのような複数のRNAは、crRNAとのハイブリダイゼーションのための第1および第2のドメインを提供する。一部の実施形態において、1つ以上のRNAを使用して複数のtaRNAをハイブリダイゼーションを介して近接させてそれらがリボレギュレーターと効率的にハイブリダイズすることを可能とすることができる。このような実施形態の例を図9および10に説明する。

#### 【0021】

別の態様において、本発明は、前記crRNAリボレギュレーター of 1つ以上、および／または前記トランス活性化RNA（taRNA） of 1つ以上を含むシステムを提供する。taRNAは、全て天然存在RNAであり得、またはそれらは、全て非天然存在RNAであり得、またはそれらは天然存在RNAおよび非天然存在RNAの混合物であり得る。

#### 【0022】

本発明のシステムは、複数の、それらの中で最小のクロストークを有するリボレギュレーター（例えば、コグネートtaRNA／トリガーRNAと場合により一緒の複数のcrRNA／スイッチ）を含み得る。一部の実施形態において、システムは、最小のクロストーク（例えば、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満またはそれより小さいレベルにおいて）を有する少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個以上のトーホールドcrRNA／スイッチを含み得る。一部の実施形態において、トーホールドcrRNA／スイッチは、50、100、150、200、250、300、350、400超またはそれより大きい平均オン／オフ蛍光比を有する。一部の実施形態において、本発明は、約200～665の範囲内、例として約400の平均オン／オフ蛍光比を有する複数のトーホールドcrRNA／スイッチを有するシステムを提供する。一部の実施形態において、システム中の複数のトーホールドリボレギュレーターの中のクロストークのレベルは、約2%から20%未満、または約2%から約15%、または約5%から約15%の範囲である。このようなシステムは、7つ以上、例として、8、9、10個などのトーホールド

リボレギュレーターを含み得る。

【0023】

一部の実施形態において、システムは、細胞である。一部の実施形態において、細胞は、原核細胞である。

【0024】

一部の実施形態において、システムは、無細胞インビトロシステムである。

【0025】

一部の実施形態において、c r R N A リボレギュレーターおよび t a R N A は、互いにハイブリダイズされる。

【0026】

一部の実施形態において、c r R N A リボレギュレーターと t a R N A との比は、1 未満、0.5 未満、または 0.1 未満である。

【0027】

一部の実施形態において、c r R N A リボレギュレーターまたはリボレギュレーターシステムは、第 1 の核酸中に含まれ、t a R N A は、第 2 の核酸中に含まれる。一部の実施形態において、第 1 の核酸は、第 1 のプラスミドであり、第 2 の核酸は、第 2 のプラスミドである。一部の実施形態において、第 1 のプラスミドは、中コピー複製起点を含み、第 2 のプラスミドは、高コピー複製起点を含む。プラスミドは、D N A プラスミドまたは R N A プラスミドであり得る。

【0028】

別の態様において、本発明は、前記 c r R N A リボレギュレーターもしくはリボレギュレーターシステムのいずれかを含み、または前記 c r R N A リボレギュレーターもしくはリボレギュレーターシステムのいずれかをコードする配列を含む核酸を提供する。別の態様において、本発明は、前記核酸のいずれかを含む宿主細胞を提供する。

【0029】

別の態様において、本発明は、前記トランス活性化 R N A ( t a R N A ) のいずれかを含み、または前記 t a R N A のいずれかをコードする配列を含む核酸を提供する。別の態様において、本発明は、その核酸を含む宿主細胞を提供する。

【0030】

別の態様において、本発明は、試料中の R N A の存在を検出する方法であって、前記トーホールド c r R N A リボレギュレーターシステムのいずれかを試料と ( c r R N A リボレギュレーターは、内因性 R N A に相補的なトーホールドドメインを含み、リボレギュレーターシステムは、レポータータンパク質をコードするコードドメインを含む)、内因性 R N A の存在下でコードドメインの翻訳を可能とするが、内因性 R N A の不存在下で可能としない条件下で合わせることに、レポータータンパク質を内因性 R N A の指標として検出することを含む方法を提供する。本明細書において使用される、コードドメインの翻訳を可能とする条件は、R N A からタンパク質を産生するための全ての必要な機構、例えば、限定されるものではないが、リボソーム、t R N A などを含む条件である。

【0031】

別の態様において、本発明は、細胞中の R N A の存在を検出する方法であって、細胞中に前記トーホールドリボレギュレーターシステムのいずれか ( c r R N A リボレギュレーターは、細胞中の内因性 R N A に相補的なトーホールドドメインを含み、リボレギュレーターシステムは、レポータータンパク質をコードするコードドメインを含む) を導入することと、レポータータンパク質を内因性 R N A の指標として検出することを含む方法を提供する。一部の実施形態において、レポータータンパク質は、緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) である。一部の実施形態において、レポータータンパク質の量は、内因性 R N A の量の指標である。

【0032】

別の態様において、本発明は、タンパク質翻訳を制御する方法であって、前記トーホールドリボレギュレーターシステムのいずれかを前記相補的 t a R N A のいずれかと (トー

10

20

30

40

50

ホールド c r R N A リボレギュレーターは、t a R N A に相補的なトーホールドドメインを含み、トーホールドリボレギュレーターシステムは、非レポータータンパク質をコードするコードドメインを含む)、t a R N A の存在下でコードドメインの翻訳を可能とするが、t a R N A の不存在下で可能としない条件下で合わせることを含む方法を提供する。

**【0033】**

別の態様において、本発明は、ビーコンリボレギュレーターシステムであって、  
(1) リボソーム結合部位を含む完全または部分二本鎖ステムドメインと、ループドメインとを含むビーコン c r R N A リボレギュレーターと、(2) コードドメインと、(3) ステムドメインとコードドメインとの間に存在する開始コドンとを含むシステムを提供する。

10

**【0034】**

一部の実施形態において、ステムドメインは、開始コドンの上流(5')配列を含む。一部の実施形態において、開始コドンの上流配列は、約6ヌクレオチドである。

**【0035】**

一部の実施形態において、コードドメインは、レポータータンパク質をコードする。一部の実施形態において、レポータータンパク質は、緑色蛍光タンパク質(GFP)である。一部の実施形態において、コードドメインは、非レポータータンパク質をコードする。

**【0036】**

一部の実施形態において、ループドメインは、天然存在RNAに配列において相補的である。一部の実施形態において、ループドメインは、非天然存在RNAに配列において相補的である。一部の実施形態において、ループドメインは、約21ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、ループドメインは、約15~30ヌクレオチドの長さの範囲である。

20

**【0037】**

一部の実施形態において、ビーコン c r R N A リボレギュレーターは、ループドメインが挙げられるがそれに限定されない結合ドメイン(すなわち、その相補的 t a R N A にハイブリダイズするドメイン)を含む。結合ドメインは、約9ヌクレオチド長であり得、ステムドメイン中に存在し得るループドメインの上流(5')領域を含み得る。

**【0038】**

ステムドメインは、約23bp長であり得る。ステムドメインは、約15bpから約30bpの範囲であり得る。

30

**【0039】**

別の態様において、本発明は、前記ビーコンリボレギュレーターのいずれかのループドメインにハイブリダイズし、二次構造を含まず、または最小の二次構造を含む第1のドメインと、ループドメインの上流(5')配列にハイブリダイズし、ステムドメイン中に存在する第2のドメインとを含むトランス活性化RNA(taRNA)を提供する。一部の実施形態において、第1のドメインは、ループドメインに100%相補的である。

**【0040】**

別の態様において、本発明は、コードドメインに場合により作動可能に結合している前記ビーコン c r R N A リボレギュレーターのいずれかの1つ以上と、前記相補的トランス活性化RNA(taRNA)のいずれかとを含むシステムを提供する。

40

**【0041】**

一部の実施形態において、システムは、細胞である。一部の実施形態において、細胞は、原核細胞である。一部の実施形態において、システムは、無細胞インビトロシステムである。

**【0042】**

一部の実施形態において、ビーコン c r R N A リボレギュレーターおよび t a R N A は、互いにハイブリダイズされる。

**【0043】**

一部の実施形態において、ビーコン c r R N A リボレギュレーターと t a R N A との比

50

は、1未満、0.5未満、または0.1未満である。

【0044】

一部の実施形態において、ビーコンc rRNAリボレギュレーター（またはシステム）は、第1の核酸中に含まれ、t aRNAは、第2の核酸中に含まれる。一部の実施形態において、第1の核酸は、第1のプラスミドであり、第2の核酸は、第2のプラスミドである。一部の実施形態において、第1のプラスミドは、中コピー複製起点を含み、第2のプラスミドは、高コピー複製起点を含む。プラスミドは、DNAプラスミドまたはRNAプラスミドであり得る。

【0045】

別の態様において、本発明は、前記ビーコンc rRNAリボレギュレーター（またはシステム）のいずれかまたは前記ビーコンc rRNAリボレギュレーター（またはシステム）のいずれかをコードする配列を含む核酸を提供する。別の態様において、本発明は、前記核酸を含む宿主細胞を提供する。

10

【0046】

別の態様において、本発明は、前記トランス活性化RNA（t aRNA）のいずれかまたは前記t aRNAのいずれかをコードする配列を含む核酸を提供する。別の態様において、本発明は、前記核酸を含む宿主細胞を提供する。

【0047】

別の態様において、本発明は、試料中のRNAの存在を検出する方法であって、ビーコンリボレギュレーターシステムを試料と（ビーコンc rRNAリボレギュレーターは、内因性RNAに相補的なループドメインを含み、ビーコンリボレギュレーターシステムは、レポータータンパク質をコードするコードドメインを含む）、内因性RNAの存在下でコードドメインの翻訳を可能とするが、内因性RNAの不存在下で可能としない条件下で合わせることに、レポータータンパク質を内因性RNAの指標として検出することを含む方法を提供する。

20

【0048】

別の態様において、本発明は、細胞中のRNAの存在を検出する方法であって、細胞中にビーコンリボレギュレーターシステム（ビーコンc rRNAリボレギュレーターは、細胞中の内因性RNAに相補的なループドメインを含み、ビーコンリボレギュレーターシステムは、レポータータンパク質をコードするコードドメインを含む）を導入することと、レポータータンパク質を内因性RNAの指標として検出することを含む方法を提供する。

30

【0049】

一部の実施形態において、レポータータンパク質は、緑色蛍光タンパク質（GFP）である。

【0050】

一部の実施形態において、レポータータンパク質の量は、内因性RNAの量の指標である。

【0051】

別の態様において、本発明は、タンパク質翻訳を制御する方法であって、ビーコンリボレギュレーターシステムを相補的t aRNAと（ビーコンc rRNAリボレギュレーターは、t aRNAに相補的なループドメインを含み、ビーコンリボレギュレーターシステムは、非レポータータンパク質をコードするコードドメインを含む）、t aRNAの存在下でコードドメインの翻訳を可能とするが、t aRNAの不存在下で可能としない条件下で合わせることを含む方法を提供する。

40

【0052】

本発明のこれらのおよび他の態様および実施形態を本明細書においてより詳細に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0053】

50

【図1】 トーホールドリボレギュレーター c r R N A 塩基設計の模式図。対応する t a R N A は、配列 5' - b - a - 3' を有し、ドメイン a および b は、それぞれドメイン a\* および b\* の逆相補鎖である。

【図2】 6つの不活性化トーホールドリボレギュレーター c r R N A の抑制レベルの特性決定。

【図3】 高性能トーホールドリボレギュレーターについて得られたオン／オフモード蛍光比。

【図4】 I P T G による誘導 3 時間後に 6 1 個のトーホールドリボレギュレーターのセットについて得られたオン／オフモード蛍光比。

【図5】 ビーコンリボレギュレーター塩基設計。t a R N A は、配列 5' - b - a - 3' を有する。

10

【図6】 6つのビーコンリボレギュレーターデバイスのセットについて得られたオン／オフ蛍光強度中央値。赤色点線は、10のオン／オフ比を示す。

【図7】 小分子RNA r y h B を標的化するビーコンリボレギュレーターの応答。リボレギュレーターセンサーは 1 m M の I P T G を使用して誘導し、r y h B は、0.5 m M の 2, 2' - ジピリジルを使用して誘導した。リボレギュレーターセンサーは、G F P の出力の約 5 倍だけの増加により、細胞内 r y h B レベルの増加に応答した。

【図8 A】 配列 5' - b - a - 3' を有する標的をセンシングするようにプログラミングされた (A) トーホールドおよび (B) ビーコンリボレギュレーターをベースとする他の内因性センサーについて模式的な設計。両方の設計は、A U G スタートコドンの前後に強力な RNA 二本鎖を用いてタンパク質翻訳を抑制する。(A) 重要な二次構造を有する RNA 標的の強力な結合を促す伸長トーホールド (一部の実装において 21ヌクレオチド (n t) 超) を有するトーホールドリボレギュレーター。c r R N A ステム巻き戻し領域は、サイズが低減されるが、翻訳のトランス活性化を可能とする。それというのも、R B S に最も近いステムは短く (典型的には、6塩基対 (b p) )、自然に巻き戻る可能性が高いためである。

20

【図8 B】 (B) ビーコンリボレギュレーターは、標的結合のためのより大型のループ (典型的には、32 n t) を有し、R B S は、目下、ループ中に存在してより大きいプログラマブル性を可能とする。

【図9 A】 2つの t a R N A が一緒に機能し、リボレギュレーター c r R N A にハイブリダイズする 5' - a - b - 3' 配列に寄与するシステムを説明する。(A) RNA 鎖 A および B が入力であり、鎖 C、c r R N A がゲートとして機能する 2 入力 A N D ゲートシステムの模式的説明。

30

【図9 B】 (B) RNA 鎖 A、B、および C の全ての組合せについて得られたオン／オフ蛍光比。

【図10】 5' - a - b - 3' 配列の部分をそれぞれ有する 2 つの t a R N A が、いかなる 5' - a - b - 3' 配列の部分も含有しない第 3 の t a R N A により近接されるシステムを説明する。

【図11 A】 リボレギュレーターを使用するインビボ 2 入力 O R 論理の実装。(a) システム中の 3 つのプログラミングされた RNA 鎖。

40

【図11 B】 (b) インビボ O R ゲート活性化の模式図。

【図11 C】 (c) システムへの異なる入力 RNA の転写時の G F P からのオン／オフ蛍光のフローサイトメトリー計測。オフの場合、ゲートに対する非コグネート t a R N A が発現される。

【図12 A】 インビボ 6 入力 O R ゲートの実装。(A、上図) O R ゲートシステムは、G F P 遺伝子上流に直列で配列された 6 つの c r R N A を含む。(A、中図) 対応する 6 つの t a R N A 入力、全て、L B / I P T G プレート上で誘導された大腸菌 (E.coli) コロニーからの G F P 発現を活性化することが見出された。対照的に、4 つの異なる非コグネート t a R N A は、O R ゲート構築物と同時に発現させた場合に G F P 産生を誘発しなかった。

50

【図12B】(B) ORゲートシステムについてのオン／オフモードGFP蛍光比のフローサイトメトリー計測。6つ全てのプログラミングされた入力RNAのtarget RNAは、最低のGFPリークレベルを有する非コグネートtarget RNAと比較して10倍超高いGFP発現を示す(Y)。

【図13A】(A) 6入力ANDゲートシステムの模式的説明。ゲートは、検証されたトーホールドリボレギュレーターcrRNAからの配列を含有する伸長ヘアピンからなる。6つの入力RNAトリガーは、対応するtarget RNAからの配列および隣接する入力鎖への結合のためのハイブリダイゼーションドメインを含有する。(B) 入力AからFの特定の組合せを受けた6ビットANDゲートについての大腸菌(E.coli)コロニーからのGFP蛍光の画像。強力なGFP発現は、最も右側の欄に示されるとおり、6つ全ての入力が存在する場合にのみ観察される。

10

【図13B】(B) 入力AからFの特定の組合せを受けた6ビットANDゲートについての大腸菌(E.coli)コロニーからのGFP蛍光の画像。強力なGFP発現は、最も右側の欄に示されるとおり、6つ全ての入力が存在する場合にのみ観察される。

【図14A】シンクRNAによるトリガーRNA不活性化のインビボ実証。(A) 論理演算の基礎をなす分子相互作用を示す模式図。シンクRNAは、トリガーへの結合についてスイッチRNAを競合妨害するように設計される。この優先的結合は、シンクも存在する場合には常にトリガーがスイッチを活性化するのを妨害する。

【図14B】(B) トリガーおよびシンクRNAの異なる組合せを用いたスイッチRNAから計測されたGFP蛍光。シンクをトリガーRNAと同時に発現させる場合、トリガー単独を発現させる場合と比較して蛍光の90パーセント(90%)の抑制が観察される。

20

【図15A】トーホールドリプレッサーの設計および性能。(A) トーホールドリプレッサーシステムの分子相互作用を示す模式的説明。トリガーRNAは、リボソームがRNA上の結合エレメントに接近するのを妨害する立体構造へのスイッチRNAのリフォールドを引き起こす。

【図15B】(B) 44個のトーホールドリプレッサーのライブラリーから計測された抑制レベル。システムの半数は、90%超の抑制を提供する。90%および80%の抑制における破線および点線をそれぞれ提供する。

【図16】高性能トーホールドリプレッサーについての時間経過計測。計測は、誘導物質IPTGの添加後に1時間おきの時点において行った。

30

【図17A】トーホールドスイッチ設計および出力特性。(A) 従来のリボレギュレーターシステムは、RBS領域への直接的な塩基対形成により翻訳を抑制する。RNA-RNA相互作用は、RNAヘアピン中のYUNRループにおけるループ-直鎖相互作用を介して開始される。相互作用開始領域を太線により示す。

【図17B】(B) トーホールドスイッチは、スタートコドンAUGの前後でプログラミングされた塩基対を通して翻訳を抑制し、RBSおよびスタートコドン領域は完全に対形成されないままである。RNA-RNA相互作用は、トーホールドと称される直鎖-直鎖相互作用ドメインを介して開始される。トーホールドドメイン(a\*)は、トリガーRNA上の相補的aドメインに結合する。次の分岐点移動は、トーホールドスイッチmRNAを脱抑制して下流遺伝子の翻訳を可能とする。

40

【図17C】(C) オンおよびオフ状態のスイッチならびに同一配列を有するGFPを発現させる陽性対照における計測されたGFPモード蛍光レベル。黒色破線は、GFP発現プラスミドを担持しないIPTG誘導細胞から得られたバックグラウンド蛍光レベルを示す。

【図17D】(D) 168個のトーホールドスイッチのセットについて得られたオン／オフGFP蛍光レベルであり、20個がオン／オフ $\geq 100$ を示す。挿入図：IPTGにより誘導後の異なる時点における変動する性能レベルの4つのトーホールドスイッチについて計測されたオン／オフGFP蛍光。

【図18A】トーホールドスイッチオルソゴナル性の包括的評価。(A) スwitch mRNAおよびトリガーRNAの676個の一对の組合せを発現する大腸菌(E.coli)コロニー

50

からの GFP 蛍光。GFP 発現コロニーは、コグネートスイッチおよびトリガー鎖を含有する細胞において対角線に沿って可視的である。非対角コンポーネントは、非コグネート RNA コンポーネント間の最小の相互作用の結果として低い蛍光を有する。

【図 18B】(B) 強力な全システムオルソゴナル性を裏付ける全てのトリガースイッチ組合せについてフローサイトメトリーにより計測されたクロストーク。

【図 18C】(C) トーホールドスイッチおよび従来のいくつかの RNA ベースレギュレーターについてのオルソゴナルライブラリーダイナミックレンジ (閾値クロストークレベルの逆数) と、オルソゴナルライブラリーサイズとの比較。

【図 19A】トーホールドスイッチの配列分析およびフォワードエンジニアリング。(A) トーホールドスイッチ出力特性に重要な領域およびパラメータ。

【図 19B】(B) スwitch mRNA ステム中のトップおよびボトム of 3 塩基対中の G-C 塩基対の数に応じた 168 個のメンバーのトーホールドスイッチライブラリーの評価。図中の背景の四角の色は、特定の GC 塩基対形成制約を満たすリボレギュレーターのセットについての平均オン/オフ GFP 蛍光に対応する。それぞれの四角内の円の色は、制約を満たすコンポーネントのそれぞれについて得られた実際のオン/オフ比に対応する。

【図 19C】(C) 13 個のフォワードエンジニアリング型トーホールドスイッチのセットについて得られたオン/オフ GFP 蛍光比。黒色破線は、168 個のランダム配列トーホールドスイッチのフルセットについて計測された平均オン/オフ蛍光レベルを示す。挿入図。フォワードエンジニアリング型スイッチ番号 6 および 9 についての経時的計測。

【図 19D】(D) 特定の値を超過するオン/オフ比を有したランダム配列およびフォワードエンジニアリング型ライブラリーコンポーネントの割合。

【図 20A】トーホールドスイッチの熱力学的分析。(A) ランダム配列トーホールドスイッチライブラリーからのオン/オフレベルのサブセットに適用された種々の熱力学的パラメータに応じた R<sup>2</sup> 値のマップ。最も強い相関は、ステムのトップにおける弱い A-U 塩基対を有するスイッチのサブセットについての  $\Delta G_{RBS}$  リンカーパラメータ (赤色で示す) について見出される。

【図 20B】(B) ステムトップ塩基対の位置および  $\Delta G_{RBS}$  リンカーを定義するために使用される配列範囲を示す模式的説明。

【図 20C】(C)  $\Delta G_{RBS}$  リンカーと、ヘアピンステムのトップにおいて A-U 塩基対を有するトーホールドスイッチライブラリー中の 68 個のコンポーネントについて計測されたオン/オフ比との間の相関。

【図 20D】(D)  $\Delta G_{RBS}$  リンカーと、フォワードエンジニアリング型システムのセットについて計測されたオン/オフ比との間の強力な相関。

【図 21A】トーホールドスイッチを使用する独立調節および mRNA ベーストリガー。(A) GFP および mCherry をそれぞれ独立して調節する RNA A および B によりトリガーされる 2 つのオルソゴナルトーホールドスイッチ。

【図 21B】(B) RNA A および B の 4 つ全ての入力組合せを発現する細胞についての GFP および mCherry 蛍光の二次元ヒストグラムは、IPTG による誘導 4 時間後の意図されるシステムの挙動を裏付ける。

【図 21C】(C) mRNA 応答トーホールドスイッチは、c\* により示される伸長トーホールドドメインを利用して大規模二次構造を有する mRNA トリガーに結合し、GFP レポーターの発現を活性化する。

【図 21D】(D) mCherry mRNA、ならびに抗生物質耐性を付与する cat および aadA mRNA により活性化された一連のトーホールドスイッチについてのオン/オフ GFP 蛍光比。

【図 21E】(E) 抑制および活性状態の mCherry センサーのフローサイトメトリーから得られたモード GFP および mCherry 蛍光。対照発現レベルは、GFP 担持プラスミドを有さない未誘導細胞および GFP または mCherry のいずれかを発現する誘導細胞から得た。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

## 【0054】

## 発明の詳細な説明

本発明は、2つの一般クラスのリボレギュレーター：トーホールドレギュレーターおよびビーコンリボレギュレーターを提供する。両方とも、種々のシステム、例として、細胞、例えば、原核細胞中のタンパク質産生（または翻訳）を活性化するために使用することができる。遺伝子発現の従来のエンジニアリング型リボレギュレーターとは異なり、それらの「デバイス」は、実質的に任意の配列の別個のRNAを使用してトランス活性化することができる。活性化RNAの配列は、リボソーム結合部位（RBS）配列に関連する必要がない。

## 【0055】

これらの新たなリボレギュレーターの利点は、多種多様である。第1に、本発明の多くのリボレギュレーターは、単一細胞中で同時に、活性であり得、それぞれがそのコグネート（特異的）標的とのみ相互作用する。このことは、複数の細胞活性の同時制御を可能とする。第2に、本発明のリボレギュレーターは、低いシステムクロストークおよび高いプログラマブル性でインビボの複合核酸回路中に取り込むことができる。第3に、本発明のリボレギュレーターは、内因性RNAからタンパク質（例えば、レポータータンパク質）産生をトリガーし得る。リボレギュレーター出力が蛍光タンパク質レポーターに結合している場合、それらのリボレギュレーターは、細胞中の内因性RNAのための遺伝子コード可能なセンサーおよびイメージングプローブとして作用する。他のタンパク質、例えば、細胞代謝に関与するものについて、それらのリボレギュレーターを使用する遺伝子発現の活性化は、細胞内因性の経路と、バイオテクノロジーにおける新たな用途のための合成遺伝子ネットワークとの間の相互作用を促進し得る。

## 【0056】

したがって、本発明は、従来記載されたリボレギュレーターと比較して大幅に改善された多様性、オルソゴナル性、および機能性を提供する種々の新規リボレギュレーターおよびそれらに由来する「デバイス」を提供する。RBSへのリボソームの結合を破壊することによってのみ翻訳を阻害する先行技術のリボレギュレーターとは対照的に、本発明のあるリボレギュレーターは、リボソームドッキングを可能とするが（一部の情况）、開始コドンへのリボソーム接近を遮断する（全ての場合）ことにより翻訳開始および通常、それからの伸長を妨害する。このアプローチの利益は、RBSがトランスRNA配列の一部であることをもはや要求されず、シャイン・ダルガノ配列へのいかなる依存性もなく、わずかな全配列制約のみで新たなリボレギュレーターの設計を可能とすることである。さらに、これらの新たなリボレギュレーターは、crRNAとトランスRNAとの間のハイブリダイゼーションを推進するためにキッシングループ相互作用に依存しない。代わりに、これらは、初期RNA-RNA相互作用を推進するスクレオチドの数を変化させることにより、および／またはその塩基組成を変化させることにより強度を簡単に合理的に制御することができる直鎖-直鎖（または大型ループ-直鎖）RNA相互作用を利用する。対照的に、キッシングループ相互作用における塩基組成および／または配列長の変化は、相互作用ドメインの三次構造に影響し、ハイブリダイゼーション反応のキネティクスを減少させ得る。

## 【0057】

## 一般のリボレギュレーター

リボレギュレーターは、オープンリーディングフレームの翻訳およびしたがってタンパク質の産生を抑制または活性化するために使用することができるRNA分子である。抑制は、mRNA分子の5'非翻訳領域（5'UTR）内の調節核酸エレメント（シス抑制RNAまたはcrRNA）の存在を通して達成される。この核酸エレメントは、相補的塩基対形成を通してステムドメインおよびループドメインを含むヘアピン構造を形成する。ヘアピン構造は、リボソームによるmRNA転写物への接近を遮断し、それにより翻訳を妨害する。一部の実施形態、例として、例えば、原核細胞を含む実施形態において、ヘアピン構造のステムドメインは、リボソーム結合部位（RBS）を封鎖する。一部の実施形態

、例として、例えば、真核細胞を含む実施形態において、ヘアピン構造のステムドメインは、mRNAの5' UTR内のスタート（または開始）コドンの上流に位置している。発現され、トランスで作用するRNA（したがって、トランス活性化RNA、またはtRNAと称される）は、crRNAと相互作用し、ヘアピン構造を変える。この変更は、スタートコドンの上流の転写領域へのリボソームの接近を可能とし、それによりRNAをその抑制状態から解放し、転写物からのタンパク質翻訳を促進する。crRNAは、典型的には、エンジニアリング型RNA分子である。tRNAは、本明細書に記載の一部の例においてエンジニアリング分子であり得るが、それらはシステム、例えば、細胞内の内因性の天然存在RNAの領域であり得る。

#### 【0058】

本発明は、一般に、核酸、構築物、プラスミド、宿主細胞およびRNA分子を使用してオープンリーディングフレームをモジュレートし、したがってその翻訳を制御するタンパク質発現の転写後調節の方法を提供する。

#### 【0059】

本発明は、モジュラーcrRNAをコードする核酸およびモジュラーtRNAをコードする核酸を企図することを理解されたい。本明細書において使用されるモジュラーcrRNAをコードする核酸は、オープンリーディングフレーム（または目的遺伝子のためのコードドメイン）を含まない核酸配列を指す。このようなモジュラーcrRNAは、トーホールドcrRNAまたはビーコンcrRNAであり得る。したがって、本発明は、最終形態の（例えば、目的遺伝子のためのコードドメインを含む）リボレギュレーターまたはリボレギュレーターコンポーネント（例えば、目的遺伝子に作動可能に結合していないトーホールドcrRNAまたはビーコンcrRNA）を企図する。

#### 【0060】

本発明は、crRNA配列を含むオリゴヌクレオチドおよびtRNA配列を含むオリゴヌクレオチドをさらに提供する。さらに、本発明は、2つ以上のオリゴヌクレオチドのセットを提供する。オリゴヌクレオチドの第1のセットは、配列がcrRNA配列と一緒に含む2つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。本発明はまた、配列がtRNA配列と一緒に含むオリゴヌクレオチドの第2のセットを提供する。容易なクローニングのため、異なるクローニングステップにおいて、2つのステム形成部分を含む単一のオリゴヌクレオチドではなく、それぞれが単一のステム形成部分を含む2つのオリゴヌクレオチドを用いてクローニングを妨げ得るオリゴヌクレオチド内のステムの形成を回避することが好ましいことがある。オリゴヌクレオチドは、本明細書に挙げられる追加のコンポーネントのいずれかとともにキット中で提供することができる。オリゴヌクレオチドは、一方または両方の末端において制限部位を含み得る。

#### 【0061】

トーホールドリボレギュレーター

トーホールドリボレギュレーターシステムにおいて、crRNA種とトランスRNA種との間の相互作用は、crRNAステムの5'末端に局在している一本鎖RNAドメインを通して媒介される。このドメインは、トーホールドドメインと称され、トランスRNAにそれがcrRNAステムを巻き戻すことを可能とするための十分な結合親和性を提供する。トランスRNAとトーホールドドメインとの間の相補性の程度は、変動し得る。一部の実施形態において、それは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%である。最適ナリボレギュレーターキネティクスのため、トランスRNAは、最小の二次構造およびcrRNAのトーホールドドメインに対して完全な相補性（すなわち、100%）を有するべきである。本明細書において使用される二次構造は、非直鎖構造、例として、例えば、ヘアピン構造、ステムループ構造などを指す。したがって、トランスRNAは、その使用条件下で二次構造を形成する可能性が全くなく、またはほとんどない配列からなることが好ましい。当業者は、手作業で、または当技術分野において利用可能なコンピュータプログラムの使用を通してそのような配列を決定することができる。

## 【0062】

トーホールドリボレギュレーター c r R N A は、そのステムドメイン内の R B S を封鎖しない。代わりに、R B S は、抑制ステムドメインにより形成されるループドメインに限定される。このことは、開始コドン直前（上流または 5'）または直後（下流または 3'）領域のステムドメイン内での封鎖を可能とし、したがって翻訳開始を妨害する。c r R N A トーホールド、ステム、およびループドメインのそれぞれの長さは、下記のとおりトーホールドリボレギュレーターの性能に影響させずに大幅に変化させることができる。さらに、c r R N A ステムドメインは、それが多数のバルジまたは誤対合塩基を含有する場合であっても、その抑制効率を保持し得、スタートコドン A U G 配列を含有しないトランス R N A がリボレギュレーターをトリガーするのを可能とする。原則として、バルジの許容性は、任意の t a R N A 配列、例として、内因性 R N A がトーホールドリボレギュレーター中への入力 R N A として作用することを可能とするが、他の基準、例えば、高度な二次構造はレギュレーターの応答に影響し得る。

10

## 【0063】

例示的な、非限定的なクラスのトーホールドリボレギュレーターは、図 1 に示される設計パラメータを有する。このクラスの c r R N A は、約 12ヌクレオチド (n t) 長であるトーホールドドメインおよび約 11 n t 長であり、場合により、3' 末端において R B S 配列 A G A G G A G A を含有するループドメインを有する。スタートコドン（すなわち、A U G）を跨ぐ 6 b p 二本鎖スパーサー領域および 9 b p 二本鎖領域を含むステムドメインは、このループドメインに直接隣接する。スタートコドンの下流（3'）9 n t は、それらがいかなるストップコドンもコードしないことを確保するようにプログラミングした。それというのも、それは翻訳の早期終結をもたらすためである。さらに、スタートコドン三つ組と反対側の 3 n t 領域を完全に対形成せず、3 n t 長バルジを有する c r R N A ステムドメインをもたらした。9 n t 二本鎖領域が目的遺伝子 (G O I) のフォールディングに影響するアミノ酸をコードする可能性を低減させるため、いくつかの低分子量残基を含有する共通の 21 n t (7 アミノ酸) スパーサードメインを、c r R N A ステムドメインとコードドメイン（例えば、G O I またはレポータータンパク質をコードするドメインとの間に挿入した。

20

## 【0064】

図 1 に説明される実施形態は、非限定的であることおよび異なる長さおよび機能の他のリボレギュレーターが本発明により企図および包含されることを理解されたい。したがって、トーホールドドメイン、ステムドメイン、ループドメインおよびリンカードメイン、ならびにステムドメイン内の二本鎖領域の長さは、図 1 に示される実施形態と長さが異なり得る。

30

## 【0065】

さらなるトーホールドリボレギュレーターシステム設計を実施例 7 に記載する。

## 【0066】

図 3 に示されるとおり、トーホールドリボレギュレーターは、t a R N A 種における標的 R N A を使用して強力なトランス活性化を示し得、誘導からわずか 2 から 3 時間後に蛍光は 200 倍超だけ増加する。同一の計測をインビボで追加の 60 個のトーホールドリボレギュレーター設計に対して実施し、オン／オフ比を図 4 に示す。試験されたリボレギュレーターのほぼ三分の一が、G F P 出力をそれらのコグネート t a R N A の存在下で 50 倍以上だけ増加させる。

40

## 【0067】

追加の実験的試験により、最適なトーホールドリボレギュレーター演算に要求される c r R N A 二次構造およびドメイン長のより良好な理解を得ることも可能となった。少なくとも 5 または 6 n t 長のトーホールドドメインが、t a R N A 初期結合に好ましい。したがって、トーホールドドメインは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20ヌクレオチド長以上であり得る。さらに、t a R N A が G O I の翻訳を可能とするために c r R N A ステムの三分の二を巻き戻す必要があ

50

るにすぎないことも見出された。これらの知見に基づき、ステムドメインは、c r R N A の適切な抑制のために12 b p ほど小さくてよい。しかしながら、ステムドメインは、12 b p よりも長くてもよく、例として、13、14、15、16、17、8、19、20以上の塩基対長であり得る。さらに、12 n t へのループ長の拡大およびわずかに強力なバージョンを有するR B S のカノニカルシャイン・ダルガノ配列による置き換えは、c r R N A による抑制の程度を減少させなかった。したがって、ループドメインの長さは、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上のヌクレオチドであり得る。トーホールドリボレギュレーターのバリエーションを図8 A に示し、実施例7により詳細に記載する。

#### 【0068】

本発明は、追加の特徴を有するc r R N A / スイッチをさらに提供する。一部の例において、ヘアピンステムのトップ3塩基は、A-U塩基対であり得る。一部の例において、ステムのボトム3塩基は、2つの強力なG-C塩基対および1つのA-U塩基対を含み得る。一部の例において、スイッチトーホールドの長さは、約12から約15 n t の範囲であり得る。この長さの特徴は、一部の例において、トリガーR N A とそのスイッチR N A との間の初期結合を強化し得る。一部の例において、ヘアピンループのサイズは、スイッチ活性化時に出力タンパク質の翻訳を向上させるために約11から約15 n t の範囲であり得る。一部の例において、ループサイズは15 n t である。さらに他の例において、スイッチシステム中の18塩基の最初の15塩基を巻き戻すコグネートトリガーを使用することができる。一部の例において、これらの特徴の1つ以上の、例として、全てを同時に使用することができる。実施例は、このようなリボレギュレーターを使用する結果を実証する。

#### 【0069】

本明細書に記載のトーホールドリボレギュレーターは、2つ以上のトリガーR N A を通して機能し、または2つ以上のトリガーR N A をセンシングする論理ゲートにおいて使用することができる。図12および13は、本発明のこれらの追加の実施形態を説明する。図12は、直鎖状で一緒に連結している複数のヘアピン構造（すなわち、ステムループ構造、c r R N A ）、および下流G O I コード配列を含むトーホールドリボレギュレーターを説明する。図中、リボレギュレーターは6つのヘアピン構造を含み、G O I はG F P である。それぞれのヘアピン構造は、入力R N A トリガー（またはt a R N A ）に相補的なトーホールド配列に連結している。入力R N A トリガー（またはt a R N A ）のそれぞれは、下流G O I の発現を活性化し得る。このリボレギュレーターは、「O R 」ゲートと称される。それというのも、それは、G O I の発現を観察するために入力R N A の1つのみの存在を要求するためである。このO R ゲートは、入力R N A トリガー（またはt a R N A ）のいずれかが発現され、その対応するc r R N A 配列に結合する場合、G F P の発現を活性化する。図は、個々の入力R N A トリガーA~Fまたは非コグネートR N A トリガーW~Zの存在下のオン/オフ蛍光比をさらに示す。オン/オフ比は、非コグネートR N A トリガーと比較して入力R N A トリガーの存在下でかなり高い。

#### 【0070】

図13は、伸長ステム領域を有する単一ヘアピン（c r R N A ）構造を含む「A N D 」ゲートを説明する。c r R N A は、t a R N A のための結合ドメインとしてそれぞれ作用する複数の領域をコードする。入力R N A （またはt a R N A ）は、互いにハイブリダイズし、c r R N A ステムの対応する部分も巻き戻し得る。このシステムは、全ての入力R N A トリガーが存在する場合にのみ活性化してc r R N A を完全に巻き戻す。これは、A N D ゲートと称される。それというのも、それは、G O I の発現を観察するために入力R N A の全てを要求するためである。図は、3、4、5および6つの入力R N A トリガーの異なる組合せの存在下のG F P 蛍光を示す写真をさらに提供する。

#### 【0071】

さらに他の態様において、本発明は、システムの活性化を妨害するため、または別の論理層をインビボ回路に付加する手段としてトリガーR N A がそのコグネートスイッチR N

10

20

30

40

50

Aに作用するのを妨害することが有用であることを認識する。本明細書において「シンクRNA」と称されるRNAを使用してトリガーRNAを活性を低減させ、または排除する方法が、本明細書において提供される。シンクRNAは、そのコグネートトリガー鎖への結合についてスイッチRNAを競合妨害するように設計される。これらのシステムにおいて、フランキング配列 $v^*$ および $u^*$ を、トリガーRNAの5'および3'末端にそれぞれ付加する(図14A)。トリガーのためのコグネートシンクRNAは、トリガーの中央の $b^* - a^*$ 領域およびそのフランキングドメインに完全に相補的である。結果的に、シンクトリガーRNA相互作用のサーモダイナミクスは、より短い $b^* - a^*$ 配列を通して生じるトリガーRNAとそのコグネートスイッチとの間の相互作用よりもかなり強力である。この効果は、シンクへのトリガーの優先的な結合をもたらし、トリガーRNAがスイッチに結合しているイベントにおいて、 $v^*$ および $u^*$ ドメインは、シンクRNAを使用して分岐点移動プロセスを完了させてトリガーをスイッチから離脱させ得る露出トーホールドとして挙動する。シンクトリガーハイブリダイゼーションをさらにより生じやすくするため、シンクRNAを、トリガーRNAよりも高いレベルにおいて発現させる。 $v^*$ および $u^*$ ドメインの長さは、特定のシステムに応じて変動し得る。いずれかのドメインをシステムから完全に除去することができ、他のドメインが存在する限り所望のネットワーク挙動を依然として保持する。換言すると、シンクRNAは、一方または両方のフランキングドメインを含み得る。一部の例において、 $v^*$ および $u^*$ ドメインは12から21 nt長であり得る。

10

#### 【0072】

20

図14Bは、モデルリードアウトとしてGFPを使用する大腸菌(E.coli)中のシンクトリガー-スイッチRNAシステムの挙動を示す。本発明は、GFPが目的タンパク質(または遺伝子)により置き換えられた他のシステムを企図することが理解される。スイッチRNAがそのまま発現される場合、GFPレポータータンパク質の低い出力が存在する。トリガーおよびスイッチが同時発現される場合、結合が生じ、スイッチは強力に活性化し、GFP出力の増加をもたらす。しかしながら、3つ全てのRNAが同時発現される場合、GFP出力は、優先的なシンクトリガーRNA結合の結果としてその完全活性化レベルから約90%降下する。全体として、出力タンパク質は、トリガーRNAがシンクの不存在下で存在する場合にのみ発現され; そうでなければ、デバイスからのタンパク質出力は低い。結果として、このシステムは、トリガーRNAがA入力を表し、シンクRNAがB入力である論理演算 $A \rightarrow \text{IMPLY} B$ を実施する。この場合、スイッチRNAは、 $A \rightarrow \text{IMPLY} B$ 演算を実施するゲートとして作用し、出力は、スイッチRNAにより調節されるタンパク質である。

30

#### 【0073】

このアプローチは、下記のトーホールドリプレッサーに直接適用することもできる。トリガー/シンク組合せがリプレッサーとともに使用される場合、システムは、トリガーRNAがシンクRNAの不存在下で発現される場合にのみオフになる。この挙動は、トリガーがA入力として機能し、シンクがB入力である $A \rightarrow \text{IMPLY} B$ 演算と同等である。

#### 【0074】

シンクRNA/トリガーRNAシステムは、閾値化回路に適用することができる。図14において示される実験は、一定レベルのトリガー、スイッチ、およびシンクRNAのそれぞれを用いた。トリガーRNAと比べて化学量論過剰のシンクRNAを発現させて細胞からのフリートリガーRNAの完全な排除も確保する。しかしながら、トリガーおよびシンクRNAの両方のレベルを変動させる場合、このシステムは閾値化挙動を提供し得る。例えば、シンクRNAの発現を中程度のレベルにおいて一定に保持するが、トリガーRNAの発現を低から高レベルに変動させる場合、スイッチRNAは、トリガーRNA濃度がシンクRNA濃度(または細胞または非細胞環境中のRNAハイブリダイゼーション挙動の変動性に従う特定の割合のシンクRNA濃度)を超過したら活性化される。あるいは、トリガーRNAの発現を一定に保持し、シンクRNAの発現を変動させる場合、シンクRNAは、トリガーRNA活性のモジュレーターとして作用し、スイッチRNAからのタン

40

50

パク質出力をシンクRNA濃度に応じて増減させる。これらの挙動は、ニューラルネットワークタイプ挙動（例えば、Qian et al. Nature, 475:368-372, 2011参照）に、および多数決および少数決ゲートの構築に使用することができる。

#### 【0075】

したがって、本発明は、スイッチRNA（目的遺伝子のためのコード配列を含む）、トリガーRNA、およびシンクRNAを含むトーホールドリボレギュレーター組成物（またはシステムもしくはデバイス）を企図する。一部の例において、トリガーRNAは、活性化RNAである（すなわち、十分なレベルにおけるその存在が、スイッチRNAからの、したがって目的コード配列のタンパク質発現（または翻訳）を活性化する）。一部の例において、トリガーRNAは、抑制RNAである（すなわち、十分なレベルにおけるその存在が、スイッチRNAからの、したがって目的コード配列のタンパク質発現（または翻訳）を抑制する）。スイッチRNA、トリガーRNAおよびシンクRNAの相互に関連する構造的特徴は、本明細書に記載のとおりである。

#### 【0076】

本明細書において簡潔に記載されるとおり、トーホールドリボレギュレーターは、タンパク質翻訳のリプレッサーとしても機能し得る。本発明によれば、新規鎖再構成機序によりトリガーRNAに応答して目的遺伝子の翻訳を抑制し得る新たなクラスのリボレギュレーターが提供される。これらのスイッチRNA／トリガーRNAリボレギュレーターシステムは、それらのトーホールドベース相互作用機序の結果として本明細書においてトーホールドリプレッサーと称される。これらのRNAデバイスの分子実装を図15Aに示す。トーホールドリプレッサーは、2つのRNA：目的遺伝子のコード配列を含有するスイッチRNA、およびスイッチからのタンパク質翻訳の停止を引き起こすトリガーRNAからなる。説明される実施例において、スイッチRNAは、約15nt長である5'-トーホールドドメインを含有する。このトーホールドに、約30nt長であり、9ntループを含有するステムを有するステムループ領域が続く。ステムを形成するドメインbおよびcは、それぞれ約18および12ntである。ステムは、ステムのボトムから3つの位置8、16、および24ntにおいてバルジを含有する。これらのバルジは、転写終結の可能性を低減させるために取り込まれるが、良好な演算に要求されない。バルジを良好なスイッチ演算を必ずしも妨害せず、他の位置に移動させ、数を増加させることもできる。演算に影響させずにループのサイズを変化させることもできる。ステム領域に、（5'から3'方向で）4ntスペーサー、RBS配列（この実装において8nt）、6ntスペーサー、スタートコドンAUG、9ntスペーサー、21ntリンカー、および次いで目的遺伝子のためのコード配列を含有する一本鎖領域が続く。スイッチRNA中のスタートコドン領域への露出RBSの結果として、発現がトリガーRNAの不存在下でオンになる。

#### 【0077】

トリガーRNAは、図15Aにおいて示されるスイッチRNAの初期領域に完全に相補的な配列を含有する一本鎖RNAであり、したがって、それは45ntの全長を有する。トリガーおよびスイッチRNAが同時発現される場合、トリガーRNAは、スイッチRNAのトーホールドドメインに結合し、スイッチステムとの分岐点移動反応を完了させる。ステムの置換は、スイッチRNAの30ntおよびループを完全に露出させる。これらに新たに露出された塩基は、急速にリフォールドし得る。この鎖再構成は、スイッチRNAの下流塩基が新たなヘアピンドメインを形成することを引き起こす。このヘアピンは、遺伝子のスタートコドンを含む領域を封鎖し、トーホールドスイッチ翻訳アクチベーターシステム中のスイッチRNAと同一の様式で抑制する。さらに、トーホールドリプレッサーにより形成されるトリガー-スイッチRNA複合体が、伸長トーホールドを有するヘアピンを生じさせ、それが次いで配列5'-b\*-a\*-3'を有する活性化トリガーRNAと相互作用して目的遺伝子／タンパク質の翻訳を再活性化し得ることは注目に値する。別個の抑制および活性化トリガーを有するこのシステムの挙動は、Aが抑制トリガーであり、Bが活性化トリガーであるA IMPLY Bゲートと同等である。

#### 【0078】

トーホールドアクチベータースイッチと同様に、トーホールドリプレッサーは、実質的に任意の配列を有するトリガーRNAを採用し得る。結果的に、高いオルソゴナル性の程度を有する大型リプレッサーライブラリーを設計することが可能である。さらに、これらを使用して外因性および内因性RNAに応答して翻訳抑制をトリガーすることができる。

#### 【0079】

本発明は、トーホールドリプレッサーをベースとする高次論理回路をさらに企図および提供する。トーホールドアクチベータースイッチとのこれらの類似性を考慮すると、トーホールドリプレッサースイッチは、翻訳アクチベーターとほぼ同様に複合論理システム中に取り込むことができる。

#### 【0080】

したがって、一部の態様は、図9、10および13において示されるシステムのリプレッサーバージョンであるNAND論理ゲートを提供する。NビットNAND論理は、機能トリガーRNAを産生するN入力RNA鎖により形成される複合体を使用して実施することができる。単純な2ビットの場合について、2つの入力RNAを、2ビットANDシステムに使用されるtaRNAと同一の様式で互いに結合するようにプログラミングする。これらの入力RNAのそれぞれは、スイッチRNAについてのコグネートトリガーの一部のみを含有し、したがってそれぞれは、スイッチの状態を変化させるために要求される分岐点移動をそのまま実施し得ない。しかしながら、両方の入力RNAが結合する場合、それらは完全なトリガーRNA配列を形成し、スイッチトーホールドに結合し、そのシステムを巻き戻して翻訳の抑制をトリガーし得る。この基本概念は、完全なトリガーRNA配列を、適切な順序で一緒に結合してトリガー配列を提供する複数の入力RNAに分割することによりNビット演算に拡張することができる。代替的アプローチにおいて、2つの入力を使用してそれぞれトリガー配列のほぼ半数を提供することができる。次いで、N-2プログラミングされた入力RNAの集合を通してこれらの2つの入力を近接させる。

#### 【0081】

他の態様は、図11および12において示されるシステムのリプレッサーバージョンであるNOR論理ゲートを提供する。NビットNOR論理は、目的タンパク質のためのコード配列の上流に位置している連結トーホールドリプレッサーを使用することにより評価することができる。単純な2ビットNORケースについて、NORゲートは、遺伝子の上流のオルソゴナルトーホールドリプレッサーのペアから構成される。いずれかのトリガーRNAの不存在下で、両方のトーホールドリプレッサーのRBSおよびスタートコドンは露出され、翻訳に利用可能である。トリガーRNAの1つのみが発現される場合、RBS-スタートコドン領域の1つは翻訳のためにフリーのままであり、リボソームは強力なヘアピンをそのパスに沿って巻き戻すために十分な処理性を有する。結果的に、2ビットNORゲートは、両方のトリガーRNAが発現され、トーホールドリプレッサードメインの両方について鎖再構成を引き起こす場合にのみオフになり得る。これらの基本概念は、NビットNORゲート演算に拡張することができる。

#### 【0082】

本明細書において提供されるリボレギュレーターは、複合論理回路中で使用することができる。一例として、トーホールドスイッチおよびトーホールドリプレッサーは、AND/NAND、OR/NOR、およびIMPLY/N-IMPLY演算のための高次論理回路中に取り込むことができる。この計算論的アプローチのモジュラリティは、連結トーホールドレギュレーターヘアピンを含有する単一の伸長ゲートRNA中でそれら全ての演算を関連入力トリガーおよびシンクRNAのネットワークとともに組み合わせることにより、いっそうより複雑な計算を可能とする。重要なことに、本明細書において提供される計算要素の基本集合は、論理演算を論理和標準形（すなわち、入れ子NOTおよびAND式に適用される外側OR演算）、例えば：

(A AND B) OR (C AND D) OR (E AND F AND G)、

またはシンクRNAを添加して：

NOT (A AND B) OR (C AND (NOT D)) OR (E AND F A

10

20

30

40

50

N D G)

における式に分解することにより任意の論理演算の評価を可能とする。

#### 【0083】

類似式を、同様に取り込まれるNANDおよびNORゲートを用いて評価することができる。トーホールドレギュレーターを使用する計算は、単一計算層で演算し（すなわち、それらは後の演算に入力として使用すべき1つの演算からの出力を要求しない）、複数の入力種を容易に統合し得、その計算速度を増加させ、より少ないゲートの使用を可能とする。このことは、他の分子計算技術、例えば、Qian et al. Science, 332:1196-1201, 2011 および Moon et al. Nature, 491:249-253, 2012により記載されているものとは対照的である。

10

#### 【0084】

いっそうさらなる実施形態は、多重入力XORおよびXNOR論理を提供し、適用する。一例として、NビットXOR (XNOR) 計算は、OR (NOR) ゲートおよびトリガー／シンクRNAの組合せを使用して実施することができる。この演算の背景の主要概念は、単純な2ビットXORケースを使用して記載することができる。この演算のために構成的に発現されるゲートRNAは、調節される遺伝子の上流の連結オルソゴナルトーホールドスイッチのペアを含有する2ビットORシステムである。これらのスイッチは、コグネートトリガーAおよびBを受容する。トリガーAおよびBの発現は、2つのオルソゴナル化学誘導物質indAおよびindBによりそれぞれ制御される。トリガーのそれぞれは、それらの対応するトリガーに優先的に結合してゲート中のスイッチヘアピンの活性化を妨害するコグネートシンクRNA A\*およびB\*を有する。重要なことに、これらにシンクRNAは、より高コピーのプラスミドから、またはトリガーRNAよりも強力なプロモーターを使用して発現させて細胞内で誘導される場合にそれらがより高濃度に達することを確保する。さらに、シンクRNA A\*およびB\*の産生は、indBおよびindAによりそれぞれ拘束される。結果的に、indAを培養培地に添加すると、トリガーAおよびシンクB\*の発現を引き起こす一方、indBの添加は、トリガーBおよびシンクA\*の産生を引き起こす。

20

#### 【0085】

一方のみの誘導物質が存在する場合、トリガーRNAおよび非コグネートシンクRNAの発現は、ゲートRNA中のスイッチヘアピンの1つの活性化を可能とする。しかしながら、両方の誘導物質が存在する場合、2つのトリガーRNAが発現されるが、シンクRNAもより高レベルにおいて転写される。これらのシンクRNAは、トリガー分子についてゲートRNAを競合妨害し、タンパク質翻訳の活性化を妨害する。誘導物質が存在しない場合、トリガーは発現されず、ゲートはオフのままである。結果として、この合成遺伝子ネットワークは、2ビットXOR論理を実施する。

30

#### 【0086】

この一般的アプローチは、N個の誘導物質のそれぞれがN-1非コグネートシンクRNAの相補鎖とともに単一トリガーRNAの発現を開始させるNビットXOR論理に拡張することができる。最後に、NビットXNORは、N個の連結トーホールドスイッチから形成されるNビットORゲートを、N個の連結トーホールドリプレッサーのセットにより置き換えることにより評価される。

40

#### 【0087】

ビーコンリボレギュレーター

ビーコンリボレギュレーターシステムにおいて、crRNAは、RBSおよび一部の場  
合においてスタートコドンを含有する変動長のステムドメインを含む（例示的実施形態  
については図5参照）。ステムドメインは、tRNA標的に相補的なヌクレオチドを含有  
するRBSの上流の約9bp領域も含む。tRNA標的の結合は、crRNA中の大型  
（約21nt）ループドメインを通して開始され、crRNAステムドメインの5'部分  
中に進行する。この大型ループ直鎖相互作用を通してのtRNA標的の結合は、cr  
RNAの残部の巻き戻しを促す機械力を提供するリジッドな二本鎖をもたらす。巻き戻し

50

後、活性化された c r R N A の R B S およびスタートコドンの両方が露出され、G O I の翻訳が可能となる。c r R N A の標的結合領域が R B S およびスタートコドンの両方から独立しているため、ビーコンリボレギュレーターは、原則として、任意の配列を採用し得る。二次構造をほとんど有さない t a R N A は、より良好な反応キネティクスを提供する。さらに標的 t a R N A は、c r R N A ステムドメインの巻き戻しを強制するために十分長くなければならない。

#### 【0088】

トーホールドリボレギュレーターデバイスに使用されたものと同じ条件を使用してビーコンリボレギュレーターを試験した。図6は、6つのビーコンリボレギュレーターについて得られたオン／オフ蛍光強度比中央値を示す。デバイスの4つは、10を超過するオン／オフ比を示し、1つの設計は200倍を超過する。

10

#### 【0089】

トーホールドリボレギュレーターのバリエーションを図8Bに示す。

#### 【0090】

本明細書に記載のとおり、トランス活性化RNA (t a R N A) (本明細書においてトリガーRNAとも称される) は、トーホールドもしくはビーコンリボレギュレーターの結合ドメイン (第1もしくは第2または第1および第2のドメイン) にハイブリダイズする配列のみを包含する小型RNA分子であり得、またはそれらは、トーホールドもしくはビーコンリボレギュレーターの結合ドメインに配列の一部のみを使用してハイブリダイズするより長いRNA分子、例えば、mRNA分子であり得る。さらに他の例において、c r R N A の活性化は、c r R N A のヘアピン構造を巻き戻すように同時に機能する2つ以上のRNAまたは他の核酸分子を要求し得る。t a R N A は、長さが変動し得る。一部の例において、t a R N A は、約30nt長である。このようなt a R N A は、本明細書、例として、実施例7に記載のとおり、12ntトーホールドドメインを有するc r R N A に結合し得る。

20

#### 【0091】

本発明のc r R N A は、ステムドメインおよびループドメインを最低限含むヘアピン構造を含む。c r R N A およびそのヘアピンは、典型的には、(a) 分子内の相補的配列が塩基対形成相互作用を介して互いにハイブリダイズする場合、二本鎖 (二重らせん、部分または完全二本鎖) 領域 (本明細書において、ステムドメインと称される) および (b) 二本鎖の一方の末端における一本鎖ループドメインを形成するための二次構造を採用する単一核酸分子またはその一部を含む。

30

#### 【0092】

図1、5および8は、種々のステムループ構造を示す。本発明の種々の実施形態において、ステムドメインは、主として二本鎖である一方、1つ以上のミスマッチ、バルジ、またはインナーループを含み得る。ステムドメインの長さは、相補的ヌクレオチドの最初のペアから相補的塩基の最後のペアまで計測することができ、ミスマッチヌクレオチド (例えば、A T、A U、G C 以外のペア)、バルジを形成するヌクレオチド、またはインナーループを形成するヌクレオチドを含む。

#### 【0093】

ヘアピンは、単一核酸分子から形成されるが、ステムドメインを形成する分子の2つの領域または配列を本明細書において「鎖」と称することができることが認識される。したがって、ステムは、本明細書において部分または完全二本鎖と称することができる。互いに相補的であり、ステムドメインを形成し得る単一分子内の核酸配列は、「自己相補的」もしくは「自己ハイブリダイズ」、または「自己ハイブリダイズ」し得ると記載される。一般に、本明細書に記載のヘアピンおよびステムドメインは、生理学的条件、例えば、細胞内に存在する条件 (例えば、生理学的条件に近いpH、温度、および塩濃度のような条件) において形成し、安定である。このような条件は、6.8から7.6のpH、より好ましくは、約7.4のpHを含む。典型的な温度は、約37℃であるが、原核細胞および一部の真核細胞、例えば、真菌細胞は、より広い温度範囲において、例として、37℃未

40

50

満またはそれより高い温度において増殖し得る。

【0094】

本発明の種々の核酸は、本明細書において非天然存在、人工、エンジニアリング型または合成と称することができる。これは、核酸が天然では見出されず、または天然存在の未操作資源中に見出されないことを意味する。非天然存在、人工、エンジニアリング型または合成核酸は、配列において天然存在核酸と類似であり得るが、その天然存在の相当物中に見出される配列に対して少なくとも1つの人工的に作出される挿入、欠失、逆転、または置換を含有し得る。エンジニアリング型核酸を含有する細胞は、エンジニアリング型細胞と称することができる。

【0095】

本発明の種々の実施形態は、互いに相補的な核酸配列を含む。一部の例において、配列は、好ましくは、完全相補的（すなわち、100%相補的）である。しかしながら、他の例において、配列は、部分的にのみ相補的である。部分相補的配列は、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%相補的であり得る。部分的にのみ相補的な配列は、互いにハイブリダイズされる場合、二本鎖領域および一本鎖領域を含む。一本鎖領域は、単一のミスマッチ、ループ（例えば、一方の鎖上の一連の連続ヌクレオチドがハイブリダイズされない場合）、バルジ（例えば、互いに対向する両方の鎖上の一連の連続ヌクレオチドが、ハイブリダイズされない場合）であり得る。相補性は、2つの配列の全長に対して、または配列の一部に対して決定することができることが認識される。

【0096】

本発明の核酸および／または他の部分は、単離することができる。本明細書において使用される「単離」は、それが天然存在資源からのものであるが、合成により作製されようが、それが通常伴うコンポーネントの少なくとも一部から離隔していることを意味する。

【0097】

本発明の核酸および／または他の部分は、精製することができる。本明細書において使用される精製は、他の化合物または実体の大部分から離隔していることを意味する。化合物または部分は、部分的に精製し、または実質的に精製することができる。純度は、重量尺度による重量により示すことができ、種々の分析技術、例えば、限定されるものではないが、質量分析、HPLCなどを使用して測定することができる。

【0098】

核酸は、一般に、骨格結合、例えば、限定されるものではないが、ホスホジエステル結合を通して一緒に結合しているヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含むポリマーを指す。核酸としては、デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）などが挙げられる。核酸は、一本鎖、二本鎖、さらには三本鎖であり得る。

【0099】

天然存在ヌクレオチドは、ヌクレオシド、すなわち、ペントース糖に結合している窒素含有塩基、および通常、ヌクレオシドのペントース糖のC-5（5'として示される）に付着しているヒドロキシル基においてエステル化された1つ以上のリン酸基からなる。このような化合物は、ヌクレオシド5'-リン酸または5'-ヌクレオチドと呼ばれる。DNAにおいて、ペントース糖はデオキシリボースである一方、RNAにおいて、ペントース糖はリボースである。窒素含有塩基は、プリン、例えば、アデニンもしくはグアニン（DNAおよびRNA中に見出される）、またはピリミジン、例えば、シトシン（DNAおよびRNA中に見出される）、チミン（DNA中に見出される）、もしくはウラシル（RNA中に見出される）であり得る。したがって、DNAの主要ヌクレオチドは、デオキシアデノシン5'-三リン酸（dATP）、デオキシグアノシン5'-三リン酸（dGTP）、デオキシシチジン5'-三リン酸（dCTP）、およびデオキシチミジン5'-三リン酸（dTTP）である。RNAの主要ヌクレオチドは、アデノシン5'-三リン酸（

A T P)、グアノシン 5' - 三リン酸 (G T P)、シチジン 5' - 三リン酸 (C T P) およびウリジン 5' - 三リン酸 (U T P) である。一般に、安定な塩基対形成相互作用は、アデニンとチミンとの間 (A T)、アデニンとウラシルとの間 (A U)、およびグアニンとシトシンとの間 (G C) で生じる。したがって、アデニンおよびチミジン、アデニンおよびウラシル、ならびにグアニンおよびシトシン (ならびに対応するヌクレオシドおよびヌクレオチド) は、互いに相補的であると称される。

#### 【0100】

一般に、核酸の一方の末端は、5' - ヒドロキシル基を有し、核酸の他方の末端は、3' - ヒドロキシル基を有する。結果として、核酸は極性を有する。核酸中の配列または部分またはドメインの位置または局在は、特定のマーカーの上流または5' に存在すると示すことができ、それはマーカーと核酸の5' 末端との間に存在することを意図する。同様に、核酸中の配列または部分またはドメインの位置または局在は、特定のマーカーの下流または3' に存在すると示すことができ、それはマーカーと核酸の3' 末端との間に存在することを意図する。

#### 【0101】

核酸は、ヌクレオチドアナログ、例として、非天然存在ヌクレオチドアナログを含み得る。このようなアナログとしては、ヌクレオシドアナログ (例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、3-メチルアデノシン、C5-プロピニルシチジン、C5-プロピニルウリジン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-メチルシチジン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアノシン、および2-チオシチジン)、化学修飾塩基、生物修飾塩基 (例えば、メチル化塩基)、挿入塩基、修飾糖 (例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース)、または修飾リン酸基 (例えば、ホスホロチオエートおよび5'-N-ホスホラミダイト結合) が挙げられる。

#### 【0102】

本発明の核酸、例として、c r RNA および t a RNA は、より大型の核酸中で提供することができる、または存在し得る。より大型の核酸は、例えば、実施例1に記載のとおり、転写およびしたがってc r RNA および t a RNA の産生を担い得る。より大型の核酸は、転写されて本発明のc r RNA および t a RNA を産生するヌクレオチド配列を含み得る。便宜性のため、本発明は、c r RNA および/または t a RNA を含むより大型の核酸を指し得るが、実際、これは、より大型の核酸がc r RNA および/または t a RNA をコードする配列を含むことを意図することを理解されたい。このようなコード配列は、より大型の核酸中の他の配列、例えば、限定されるものではないが、複製起点に作動可能に結合してよい。本明細書において使用される「作動可能に連結している」は、核酸配列の一方の産生または発現が、他方の核酸配列により制御、調節、モジュレートなどされる2つの核酸配列間の関係を指す。例えば、核酸配列の転写は、作動可能に結合しているプロモーター配列により指向され；核酸の転写後プロセッシングは、作動可能に結合しているプロセッシング配列により指向され；核酸配列の翻訳は、作動可能に結合している翻訳調節配列により指向され；核酸またはポリペプチドの輸送または局在化は、作動可能に結合している輸送または局在化配列により指向され；ポリペプチドの翻訳後プロセッシングは、作動可能に結合しているプロセッシング配列により指向される。好ましくは、第2の核酸配列に作動可能に結合している核酸配列は、そのような配列に直接または間接的に共有結合しているが、任意の有効な会合が許容可能である。

#### 【0103】

本明細書において使用される調節配列またはエレメントは、それが作動可能に結合している配列の発現 (例えば、転写、翻訳、プロセッシングなど) を指向、向上、または阻害する核酸配列の領域を意図する。この用語は、プロモーター、エンハンサーならびに他の転写および/または翻訳制御エレメントを含む。本発明のc r RNA および t a RNA 部分は、それらがc r RNA に作動可能に結合している目的遺伝子の翻訳を制御する範囲で調

節配列またはエレメントであるとなすことができる。本発明は、本発明の c r R N A および t a R N A が構成的または誘導性タンパク質発現を指向し得ることを企図する。誘導性タンパク質発現は、一時的または発生的に制御することができる。

#### 【0104】

ベクターという用語は、細胞中への第2の核酸分子の流入、例えば、伝播、輸送などを媒介し得る核酸を指す。伝播される核酸は、一般に、例えば、ベクター核酸に結合しており、例えば、その中に挿入されている。ベクターは、自律複製を指向する配列を含み得、または宿主細胞DNA中へのインテグレーションを可能とするために十分な配列を含み得る。有用なベクターとしては、例えば、プラスミド（典型的には、DNA分子であるが、RNAプラスミドも公知である）、コスミド、およびウイルスベクターが挙げられる。

10

#### 【0105】

本発明に関して、レポータータンパク質は、典型的には、c r R N A の活性化を可視化するために使用される。この目的に好適なレポータータンパク質としては、限定されるものではないが、蛍光または化学発光レポーター（例えば、G F P バリエーション、ルシフェラーゼ、例えば、ホタル (*Photinus pyralis*) またはウミシイタケ (*Renilla reniformis*) 由来ルシフェラーゼおよびその突然変異体）、酵素レポーター（例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、D H F R、C A T）などが挙げられる。e G F P は、65位におけるセリン (S e r 65) の種々の置換（例えば、T h r、A l a、G l y）を有するタンパク質のクラスである。青色蛍光タンパク質 (B F P) は、発光および励起特性を変更する66位における突然変異 (T y r から H i s への突然変異) を有する。B F P 中のこの Y 66 H 突然変異は、野生型 G F P と比較してスペクトルの青色シフトを引き起こす。シアン蛍光タンパク質 (C F P) は、Y 66 W 突然変異を有し、励起および発光スペクトル波長は B F P および e G F P のものの間である。S a p p h i r e は、495 n M における抑制励起ピークを有するが、395 における励起ピークおよび 511 n M における発光ピークを依然として保持する突然変異体である。黄色 F P (Y F P) 突然変異体は、203位における芳香族アミノ酸（例えば、P h e、T y r など）を有し、赤色シフト発光および励起スペクトルを有する。

20

#### 【0106】

本発明の種々の実施形態をRNAに関して記載するが、本発明の核酸は、RNA または DNA であり得ることを理解されたい。一般に、RNA および DNA は、細胞内でインビトロシステムを使用して、または当技術分野において公知の方法を使用する化学合成により産生することができる。オープンリーディングフレーム (O R F) の上流の c r R N A エレメントの挿入は、O R F を含む核酸を改変することにより達成することができることが認識される。

30

#### 【0107】

本発明は、c r R N A または t a R N A の転写のためのDNAテンプレートを提供する。本発明はまた、このようなDNAテンプレートを含むDNA構築物およびプラスミドを提供する。ある実施形態において、本発明は、プロモーターに作動可能に結合している c r R N A または t a R N A の転写のためのテンプレートを含む構築物を提供する。

#### 【0108】

ある実施形態において、本発明は、(i) c r R N A の転写のためのテンプレートと；(i i) テンプレートの上流に局在しているプロモーターとを含むDNA構築物を提供する。ある実施形態において、本発明の構築物またはプラスミドは、最適なO R F の挿入を可能とするための、c r R N A のためのテンプレートとして機能する構築物の一部の3'末端の下流の制限部位を含む。構築物は、c r R N A のためのテンプレートとして機能する部分の下流のポリリンカーまたはマルチプルクロニング部位の一部または全部を含み得る。構築物は、c r R N A の下流のO R F も含み得る。

40

#### 【0109】

ある実施形態において、本発明は、(i) t a R N A の転写のためのテンプレートと；(i i) テンプレートの上流に局在しているプロモーターとを含むDNA構築物を提供す

50

る。本発明は、(i) c r R N A の転写のためのテンプレートと；(i i) c r R N A の転写のためのテンプレートの上流に局在しているプロモーターと；(i i i) t a R N A の転写のためのテンプレートと；(i v) t a R N A の転写のためのテンプレートの上流に局在しているプロモーターとを含む D N A 構築物をさらに提供する。プロモーターは、同一でも異なってもよい。

#### 【0110】

構築物は、プラスミド、例えば、細菌中で複製し得るプラスミド中に取り込むことができる。ある実施形態において、プラスミドは、高コピー数プラスミド（例えば、p U C ベースまたは p B R 3 2 2 ベースプラスミド）である一方、他の実施形態において、低または中コピー数プラスミドであり、それらの用語は理解され、当技術分野において公知である。プラスミドは、異なるコピー数を提供し得る種々の複製起点のいずれかを含み得る。例えば、以下のいずれかを使用することができる（コピー数を括弧内に列記する）：C o l E 1（50～70（高））、p l 5 A（20～30（中））、p S C l O l（10～12（低））、p S O O l\*（<4（最低））。c r R N A および t a R N A の転写のために異なるコピー数を有するプラスミドを使用して細胞またはシステム中のそれらの相対量を変更することが望ましいことがある。さらに、ある実施形態において、調整可能なコピー数プラスミドを用いる。

#### 【0111】

本発明は、上記の核酸、構築物（例えば、D N A 構築物）、およびプラスミドを含むウイルスおよび細胞をさらに提供する。種々の実施形態において、細胞は、原核細胞である。種々の実施形態において、細胞は、真核細胞（例えば、真菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など）である。核酸または構築物は、組換え核酸技術を使用してウイルスゲノム中にインテグレートすることができ、核酸分子および／またはそれらの転写のためのテンプレートを含む感染ウイルス粒子を産生することができる。核酸分子、D N A 構築物、プラスミド、またはウイルスは、当技術分野において公知の種々の方法のいずれか、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム媒介形質移入、ウイルス感染などを使用して細胞中に導入することができる。

#### 【0112】

本明細書において考察されるとおり、核酸構築物は、細胞のゲノム中にインテグレートすることができる。このような細胞は、インビトロで（例えば、培養物中で）またはインビボで（例えば、生物中で）存在し得る。本発明は、本発明の核酸、D N A 構築物、および／またはプラスミドを含むトランスジェニック植物および非ヒトトランスジェニック動物をさらに提供する。このようなトランスジェニック生物を生成する方法は、当技術分野において公知である。

#### 【0113】

本発明は、種々のキットをさらに提供する。例えば、本発明は、プラスミド（第1のプラスミドは、(i) c r R N A の転写のためのテンプレートと、(i i) c r R N A エレメントの転写のためのテンプレートの上流に局在しているプロモーターとを含む）と、場合により、(i) コグネート（相補的）t a R N A エレメントの転写のためのテンプレートと、(i i) t a R N A エレメントの転写のためのテンプレートの上流に局在しているプロモーターとを含む第2のプラスミドとを含むキットを提供する。プロモーターは、同一であっても、好ましくは、異なってもよい。プロモーターの1つ以上は、誘導性であり得る。プラスミドは、同一または異なるコピー数を有し得る。本発明は、c r R N A エレメントの転写のためのテンプレートおよびc r R N A エレメントの転写のためのテンプレートの上流に局在しているプロモーターを含み、コグネートt a R N A エレメントの転写のためのテンプレートと、コグネートt a R N A エレメントの転写のためのテンプレートの上流に局在しているプロモーターとをさらに含む単一のプラスミドを含むキットをさらに提供する。ある実施形態において、プラスミドは、c r R N A エレメントの転写のためのテンプレートの上流または下流の1つ以上の制限部位を含む。下流の場合、制限部位は、最適なオープンリーディングフレームの挿入に使用することができる。キットは、

以下のコンポーネントの1つ以上をさらに含み得る：(i) 1つ以上の誘導物質；(ii) 宿主細胞（例えば、原核または真核宿主細胞）；(iii) 1つ以上の緩衝液；(iv) 1つ以上の酵素、例えば、制限酵素；(v) 核酸単離および／または精製試薬；(vi) c r RNAまたはt a RNA配列を欠く対照プラスミド；(vii) c r RNAもしくはt a RNA配列またはその両方を含有する対照プラスミド(viii) 配列決定プライマー；(ix) 使用説明書。対照プラスミドは、レポーター配列を含み得る。

#### 【0114】

本発明のリボレギュレーターは、一部の例において、コンセンサス原核RBSを含む。しかしながら、本発明の種々の実施形態において、種々の代替配列のいずれかをRBSとして使用することができる。多数の細菌リボソーム結合部位の配列が決定されており、それらの配列の重要な特徴は公知である。高レベル翻訳に好ましいRBS配列は、AUGに対して-6から-11位におけるGリッチ領域を含有し、典型的には、-3位におけるAを含有する。本発明において使用される例示的RBS配列としては、限定されるものではないが、AGAGGAGA（またはこの配列の部分配列、例えば、少なくとも6ヌクレオチド長の部分配列、例えば、AGGAGG）が挙げられる。より短い配列、例えば、AGGA、AGGGAG、GAGGAGなども許容可能である。多数の合成リボソーム結合部位が作出されており、それらの翻訳開始活性が試験されている。種々の実施形態において、任意の天然存在RBSを、c r RNA構築物中で使用することができる。RBSとして機能する任意の候補配列の活性は、任意の好適な方法を使用して試験することができる。例えば、発現は、公開PCT出願の国際公開第2004/046321号の実施例1に記載のとおり、またはその公開PCT出願の参考文献53に記載のとおり、例えば、AUGの上流に適切に位置している候補RBSを含有するmRNAによりコードされるレポータータンパク質の活性を計測することにより計測することができる。好ましくは、本発明において使用されるRBS配列は、コンセンサスRBSが翻訳を支持するレベルの少なくとも10%のレベルにおいて翻訳を支持する（例えば、レポータータンパク質の活性により計測して）。例えば、候補RBSをコンセンサスRBSに代えて対照プラスミド中に挿入する場合、計測される蛍光は、コンセンサスRBSを使用して計測されるものの少なくとも10%である。ある実施形態において、コンセンサスRBSが翻訳を支持するレベルに対して少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のレベルにおいて翻訳を支持するRBSを使用する。本発明のある実施形態において、コンセンサスRBSよりも高いレベルにおいて翻訳を支持するRBSを使用する。

#### 【0115】

リボレギュレーターに関するさらなる一般的教示は、公開PCT出願の国際公開第2004/046321号に見出され、その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0116】

トーホールドおよびビーコンリボレギュレーターの利点

本発明のリボレギュレーターは、既存の技術と比較して多数の利益を提供する。例えば、定量リアルタイムPCR(qRT-PCR)は、RNAレベルの高度に感受性の検出を提供し、ノザンプロットは、高特異性を示し、マイクロアレイは、数千の標的の同時検出を可能とする。しかしながら、これら全ての技術において、細胞を犠牲にして定量のためにRNAを得なければならず、したがって、リアルタイムでRNAレベルを計測することが困難である。蛍光インサイチュアライズ（FISH）および蛍光RNAアプタマーの使用は、細胞内部のRNA局在化の可視化を可能とする。FISHは、可視化のために細胞の固定を要求し、ハイブリダイゼーションは、高価なプローブを使用して多くの時間を要する。RNAアプタマーを使用して生細胞中のRNAをイメージングすることができ；しかしながら、最大蛍光強度を有するそれらのアプタマーは、ほとんどの光学顕微鏡における検出のために内因性RNAのコピー数をかなり超過するコピー数を依然として要求する。RNAレベルは、RNA標的と同一のプロモーターから推進される蛍光レポータータンパク質を使用して計測することもできる。この方法におけるレポーター

は、RNA 標的のレベルを反映し得るが、それはプロモーター領域から遠い（例えば、数千キロベース）染色体領域からの調節挙動を反復発生し得ない。さらに、プロモーターの追加のコピーの存在は、標的遺伝子から離れた RNA ポリメラーゼ活性をタイトレートし得る。最後に、結合タンパク質と蛍光タンパク質レポーターとの融合物を使用して細胞内部の RNA の局在化およびレベルを計測するために、タンパク質結合アダプターによりタグ化された RNA も使用されている。しかしながら、この技術は、可視化すべき RNA に対応する遺伝子のタグ化またはノックアウトのいずれかの染色体改変を要求する。本発明のリボレギュレーターは、先行技術のこれらの種々の限定により阻害されない。

#### 【実施例】

#### 【0117】

10

#### 実施例 1

トーホールドリボレギュレーターおよびレポータータンパク質／GOI

図 1 の例示的リボレギュレーターを実験的に試験した。GOI は、半減期を約 110 分に設定する ASV 分解シグナルによりタグ化された EGFP バリエーション GFPMut3b であった。crRNA にコグネートの tRNA は、最小の二次構造および crRNA の 30 nt 長の標的結合部位に対して完全な相補性を有するようにソフトウェアパッケージ NUPACK を使用して設計した。

#### 【0118】

リボレギュレーターは、大腸菌 (E.coli) BL21 DE3 star、T7 RNA ポリメラーゼを担持するラムダファージ溶原菌を含有する RNA ーゼ E 欠損株中で、IPTG 誘導性 lacUV5 プロモーターの制御下で試験した。crRNA および tRNA 構築物を別個のプラスミドから発現させて crRNA と、コグネートおよび非コグネート tRNA 配列との相互作用の迅速な特性決定を可能とした。crRNA および tRNA の両方について、転写を上流 T7 プロモーターから開始させ、T7 RNA ポリメラーゼ終結シグナルを使用して転写を終結させた。crRNA-GFP 転写物は、中コピー数 colA 起点を有するプラスミドから生成した一方、tRNA 転写物は、colE1 起点を有する高コピー数プラスミドから生成した。プラスミドコピー数のこれらの変動は、完全誘導細胞内部の crRNA と比較して推定で 7 倍過剰の tRNA をもたらした。この比は、従来の研究および類似し、典型的なコピー数の差はアンチセンス RNA およびその標的について観察される。

20

30

#### 【0119】

インビボ試験を、crRNA およびそのコグネート tRNA 標的（オン状態株）ならびに crRNA および非コグネート tRNA（オフ状態株）により形質転換された大腸菌 (E.coli) 中で実施し、1 mL の選択 LB 培地中で 37 °C において気体透過性シールにより覆われた深ウェル 96 ウェルプレート中で一晚増殖させた。オンおよびオフ状態リボレギュレーターの条件の両方における 2 つのプラスミドによる大腸菌 (E.coli) の形質転換により、転写されている少なくとも外因性 RNA の数に関して両方の株を類似の代謝負荷に供することを確保した。一晚培養物を 100 倍希釈し、37 °C において深ウェルプレート中で 80 分間増殖させた。次いで、初期対数期の細胞を 0.1 mM の IPTG により誘導し、フローサイトメトリーを介する特性決定のためにアリコートをして 1 時間ごとの時点において採取した。試料間の GFP 蛍光強度の比較のため、モード GFP 強度をフローサイトメトリーデータから作成された蛍光強度ヒストグラムから計算した。

40

#### 【0120】

リボレギュレーター性能の第 1 の尺度として、crRNA-GFP 構築物の蛍光強度を、同一 BL21 DE3 star 大腸菌 (E.coli) 株中で同一レベルの IPTG において誘導された非シス抑制 GFP 構築物からの蛍光と比較した。これらの計測は、6 つの試験リボレギュレーター crRNA について極端に高いレベルの翻訳抑制を実証し、蛍光出力を 99.5 % 以上だけ低減させた（図 2 参照）。リボレギュレーターのトランス活性化の有効性を計算するため、コグネート tRNA の存在下の crRNA-GFP のモード GFP 蛍光を、非コグネート tRNA の存在下の crRNA-GFP の蛍光と比較した。これら 2 つ

50

の数字を割ることにより、オン／オフ比を試験リボレギュレーター全てについて計算した。図3は、高性能トーホールドリボレギュレーターについて1時間ごとの時点において採取されたこのオン／オフ比を提示する。エラーバーは、3つの生物学的レプリケートから計算されたオン／オフ比における標準偏差である。これらのデータから、トーホールドリボレギュレーターは標的RNAによる強力なトランス活性化を示し得、誘導からわずか2から3時間後に蛍光が200倍超だけ増加することが明確である。

#### 【0121】

同一の計測を、追加の60個のトーホールドリボレギュレーター設計に対してインビボで実施し、オン／オフ比を図4に示す。試験されたりボレギュレーターのほぼ三分の一が、GFP出力をそれらのコグネート標的の存在下で50倍以上だけ増加させる。

10

#### 【0122】

##### 実施例2

##### ビーコンリボレギュレーター

トーホールドリボレギュレーターに使用されたものと同一の条件を使用してビーコンリボレギュレーター、例えば、図5に示される構造を有するものを試験した。図6は、6つのビーコンリボレギュレーターについて得られたオン／オフ蛍光強度比中央値を示す。デバイスの4つは、10を超過するオン／オフ比を示し、1つの設計は200倍を超過する。

#### 【0123】

##### 実施例3

20

##### 内因性RNAセンシング

本明細書に記載の新規リボレギュレーターは、内因性RNAの検出に使用することができる。概念実証として、大腸菌(E.coli)中で小型RNA ryhBによりトリガーすることができるビーコンリボレギュレーターを設計および生成した。ryhBは、大腸菌(E.coli)中で鉄レベルが低い場合に上方調節される90nt長の非コードRNAである。このRNAは、培養培地への鉄キレーター2, 2'-ジピリジルの添加を通して誘導することができる。

#### 【0124】

この内因性センサーを試験するため、GFPレポーターの上流にビーコンリボレギュレーターを含有するプラスミドを構築した。crrRNA転写物の発現は、IPTG誘導性PllacO-1プロモーターを使用して制御した。リボレギュレーターセンサープラスミドにより形質転換されたMG1655大腸菌(E.coli)細胞を、1mMのIPTGにより初期対数期において誘導した。同時に、鉄キレーターの添加を通してryhB発現を誘導した。2時間後に回収された細胞から採取されたフローサイトメトリー計測は、2, 2'-ジピリジルにより誘導されなかった対照集団と比較してryhB含有細胞についてGFP蛍光強度の5倍増加を実証した(図7)。さらに、PllacO-1プロモーター下の非抑制GFPレポーターを含有する対照細胞は、IPTG単独で誘導されたものと比較してIPTGおよび2, 2'-ジピリジルの両方により誘導された場合、蛍光強度の減少を示した。この追加の対照は、センサーからのGFP出力が、鉄キレーターの添加により引き起こされる転写レベルの増加により引き起こされなかったことを実証する。

30

40

#### 【0125】

##### 実施例4

##### リボレギュレーターを使用する複合OR論理演算の遺伝子コード化

本発明者らは、リボレギュレーターライブラリーのメンバーを使用して複数の論理OR演算をインビボで良好に実施した。最も単純なOR演算は、入力の一つが存在する場合に論理ゲートを活性化する2つの入力AおよびBを含む。本発明者らは、2つの高性能リボレギュレーターを選び、それらをGFPのためのコード配列の上流に同一のmRNAに沿って順次配置することにより、このシステムをインビボで簡単に実行した(図11a)。インビボでのこのゲートの意図される演算を図11bに示す。いずれかの入力RNA分子が細胞中に存在する場合、それはその対応するcrrRNAモジュールに結合し、その

50

システムを巻き戻すことによりモジュールを脱抑制する。タンパク質翻訳に関与するリボソームは強力RNAヘリカーゼ活性を有するため、それは下流crRNAをそのパスで巻き戻し得、翻訳は妨げられないままである。2入力ORゲートのフローサイトメトリーにより、いずれかのプログラミングされたtRNA入力が転写された場合にGFP発現の強力な活性化が明らかになった(図11c)。さらに、crRNAの位置を交換した並行実験は、類似のシステム性能を示した。

#### 【0126】

2入力ゲートの良好な実装により端を発し、本発明者らは、GFPの上流に配置された6つのcrRNAモジュールを特徴とする6入力OR論理システムを追求した(図12)。OR論理システム中の親crRNAの3つがストップコドンを含むため、本発明者らは、それらの不所望なコドンを除くようにそれらの配列を改変し、それらを個々に試験してストップコドン不含バリエーションがそれらの親の活性を保持することを確保した。これらの試験に続き、遺伝子集積を使用して474bpの6crRNA構築物を合成し、異なるtRNAエレメントを発現するプラスミドとともに大腸菌(E.coli)中に形質転換した。6入力ORmRNAおよびコグネートtRNAの1つの両方を発現する細胞は、誘導物質IPTGを含むプレート上で計測した場合、強力なGFP蛍光を示す。しかしながら、4つの非コグネートtRNAのセットは、GFPの顕著な発現を活性化せず、本発明者らのインビボ論理的枠組みの優れたオルソゴナル性を強調した。これらの形質転換体からのフローサイトメトリー計測も、良好なORゲート演算を裏付け、6つ全ての入力は、4つの非コグネートtRNAのセットと比較して少なくとも5倍高いGFP出力を提供した。

#### 【0127】

##### 実施例5

リボレギュレーターを使用する複合AND論理演算の遺伝子コード化

本発明者らは、トーホールドリボレギュレーターを使用するAND論理演算を実施するための一般化可能なシステムを開発した。図9は、GFPレポーター配列の上流のcrRNA配列を特徴とする2入力ANDゲートを示す。システム中の2つの入力は、crRNAゲートのコグネートtRNA配列の半分を含む2つのRNA配列AおよびBである(図9A)。2つの入力RNAは、それらが細胞内部に存在する場合に両方のRNAの互いの結合を可能とするハイブリダイゼーションドメイン(u-u\*)も有する。このハイブリダイゼーションイベントが生じる場合、2つのtRNAの半分が近接し、ゲートcrRNAを巻き戻してGFPの翻訳をトリガーし得る配列を提供する。入力RNAのそれぞれは、そのまま発現される場合、そのcrRNAを脱抑制し得ない。それというのも、それらは、(1) crRNAステムの十分に長い領域を巻き戻し得ないため(入力Bについてのケースである)、または(2) それらは、動力学的および熱力学的にcrRNAへの結合が損なわれるためである(入力Aについてのケースである)。2入力AND論理システムについてのフローサイトメトリー計測は、大腸菌(E.coli)中のその演算を検証する(図9B)。GFP出力は、システム中の3つ全てのRNAが細胞内部で発現される場合にのみ活性化される一方、それは全ての他のケースにおいて低い。

#### 【0128】

トーホールドリボレギュレーターをベースとするANDゲートは、6ビット演算に良好に拡張された。図13Aに示されるとおり、このシステム中のゲートは、6つの検証トーホールドリボレギュレーターcrRNAのステム配列および最底crRNAからのトーホールド配列からなる伸長ステムを有するヘアピンからなる。したがって、入力RNAは、対応するtRNA配列を含むし、それらの隣接入力鎖に対するハイブリダイゼーション配列も有する。所与の入力のハイブリダイゼーション配列は、次の入力RNAのトーホールド結合ドメインに相補的である。例えば、入力Aは、入力Bが結合する12から15nt配列を含むし、この配列は、入力BのコグネートcrRNAのためのトーホールドである。結果的に、ゲートへの入力Aの結合が、そのステムのボトム塩基を巻き戻し、入力Bの結合のための新たなトーホールドも提供する。このステム巻き戻し/トーホールド提示

プロセスは、全ての入力ゲートに結合するまで反復する。全ての入力の結合時、RBSおよびスタートコドンは脱抑制され、それによりGFPまたは別の目的タンパク質の産生がトリガーされる。本発明者らは、ゲートmRNAも発現する大腸菌(E.coli)中で入力RNAの異なる組合せを発現させることにより、このゲートを検証した。図13Bは、LBプレート上で誘導されたコロニーから計測されたGFP強度を示す。強力なGFP蛍光は、6つ全ての入力ゲートが細胞中で発現される場合にのみ可視的である。GFP発現は6つの他の入力の組合せ、例として、入力RNAの1つを除き全てが発現されるストリンジェントな試験において低い。

#### 【0129】

##### 実施例6

##### リボレギュレーター・トーホールドリプレッサー

本発明者らは、44個のトーホールドリプレッサー(デバイス/システム)のライブラリーを構築し、それらの機能を大腸菌(E.coli) BL21 Star DE3中で試験した。本発明者らは、フローサイトメトリーを使用してシステムの性能を試験し、オフ状態(すなわち、コグネートトリガーの存在下)；およびオン状態(すなわち、コグネートトリガーの不存在下)のスイッチからモードGFP蛍光を計算した。次いで、本発明者らは、式：

$\%抑制 = 1 - [オフ状態モード蛍光 \div オン状態モード蛍光]$

を使用して抑制レベルパーセントを計算した。

#### 【0130】

図15Bは、ライブラリー中の44個のリプレッサーについて得られた%抑制レベルを示す。リプレッサー40から44は、高度に変動する性能を有する。本発明者らは、それらの挙動が、スイッチRNAのフォールディングの不安定性に起因し、それがトリガーRNAが存在しない場合であってもスイッチRNAのオン状態立体構造とオフ状態立体構造との間の上下を引き起こすことを仮定する。デバイス/システムの残りは、平均してかなり十分に機能する。全ライブラリーの73%が、少なくとも80%の抑制レベルを有する。さらに、ライブラリーの50%が、90%よりも高い抑制を示す。この優れた90%の抑制レベルは、ほぼ全ての従来報告された翻訳リプレッサー(Mutalik et al., Nat. Chem. Biol. 8:447-454, 2012参照)の性能を超過する。追加の計測も、最大性能トーホールドスイッチが1時間以内に95%超の翻訳抑制を達成し、後続の時点においてレベルを99%超まで増加させ得ることを実証した(図16)。

#### 【0131】

##### 実施例7

##### トーホールドスイッチ

本明細書に記載のとおり、本発明は、新たなクラスの、公知の天然相当物を有さないいわゆるトーホールドスイッチにおける遺伝子発現の転写後リボレギュレーターを提供する。トーホールドスイッチは、トランス作用トリガーRNAに応答して調節される遺伝子を活性化する。生細胞中のこれらの演算は、2つの新規機序により促進される：インピットロ試験において開発されたトーホールドベース直鎖-直鎖RNA相互作用および開始コドンを包囲する領域中の塩基対形成を介する効率的な翻訳抑制。本発明者らは、トーホールドスイッチが100倍超だけタンパク質発現のモジュレーションを定型的に可能とすることを実証し、最良のスイッチは、タンパク質ベースレギュレーターのダイナミックレンジに匹敵する。本発明者らは、オルソゴナルコンポーネントの大型セット、例として、2%未満のシステムクロストークレベルを示し、これまで報告されたタンパク質またはRNAベースのオルソゴナル調節エレメントの最大および最もストリンジェントなファミリーを構成する18個のトーホールドスイッチのライブラリーを検証した。次いで、本発明者らは、406の平均オン/オフ蛍光比を有する13個のトーホールドスイッチのセットをフォワードエンジニアリングした。本発明者らは、熱力学的分析をさらに適用してシステム性能の変動を予測した。さらに、本発明者らは、機能mRNA分子から効率的にトリガーし得るトーホールドスイッチのセットを実証する。これらのトーホールドスイッチの高いダイナミックレンジ、オルソゴナル性、プログラマブル性、および多用途性は、それらが合

10

20

30

40

50

成生物学のための強力な新ツールであることを示唆する。

### 【0132】

#### 方法

株、プラスミド、および増殖条件。以下の大腸菌 (*E. coli*) 株を本試験において使用した: BL21 Star DE3 ( $F^{-}ompT \quad hsdS_B (r_B^{-}m_B^{-}) gal \quad dcm \quad rne131 (DE3)$ ; Invitrogen)、BL21 DE3 ( $F^{-}ompT \quad hsdS_B (r_B^{-}m_B^{-}) gal \quad dcm (DE3)$ ; Invitrogen)、MG1655Pro ( $F^{-}\lambda^{-}ilvG-rfb-50 \quad rph-1 \quad Sp^R \quad lacR \quad tetR$ )、およびDH5 $\alpha$  ( $endA1 \quad recA1 \quad gyrA96 \quad thi-1 \quad glnV44 \quad relA1 \quad hsdR17 (r_K^{-}m_K^{+}) \lambda^{-}$ )。全ての株を、適切な抗生物質を有するLB培地中で増殖させた。抗生物質は、以下の濃度において使用した: アンピシリン ( $50 \mu g \quad mL^{-1}$ )、カナマイシン ( $30 \mu g \quad mL^{-1}$ )、およびクロラムフェニコール ( $34 \mu g \quad mL^{-1}$ )。

### 【0133】

トーホールドスイッチを特性決定するため、化学コンピテント大腸菌 (*E. coli*) を、トーホールドスイッチおよびトリガープラスミドの望ましい組合せにより形質転換し、抗生物質の適切なペアを含有するLB/寒天プレート上にスプレッドした。コロニーGFP蛍光計測のため、LB/寒天プレートに0.1 mMのイソプロピル $\beta$ -D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) を補給してRNA発現を誘導した。フローサイトメトリー計測のため、抗生物質を含有するLB培地に、個々のコロニーからピックされた細胞を播種し、それを37°Cにおいて振とうさせながら一晩インキュベートした。次いで、細胞を新鮮な選択LB培地中に100倍希釈し、再び96ウェルプレート中で37°Cにおいて振とうさせた。BL21 Star DE3およびBL21 DE3中のT7 RNAポリメラーゼ推進発現のため、細胞を、0.1 mMのIPTGにより、増殖80分後の0.2~0.3のOD600において誘導した。特に記載のない限り、細胞培養物に対する計測をIPTGの添加3時間後に行った。構成的PN25プロモーターを使用する発現のため、一晩培養物を選択LB培地中に100倍希釈した。この希釈の時間は、後続の計測のために $t=0$ として定義した。

### 【0134】

プラスミド構築。全てのDNAオリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologies, Incから購入した。二本鎖トリガーおよびスイッチDNAは、ユニバーサルプライマーを使用して増幅された単一の $>100 \text{ nt}$ オリゴヌクレオチドから、またはgene2oligo(Rouillard et al., Nucleic Acids Res 32:W176-180, 2004)を使用してセグメント化された短い $<50 \text{ nt}$ オリゴヌクレオチドからの遺伝子集積を使用して産生した。次いで、30 bp重複領域を用いるGibsonアセンブリー (Gibson et al., Nat. Methods 6:343-345, 2009) を使用してこれらのPCR産物をベクター骨格中に挿入した。ユニバーサル骨格プライマーを使用してベクター骨格をPCR増幅させ、消化してからDpnI (New England Biolabs, Inc.) を使用して集積した。骨格は、T7ベース発現プラスミドpET15b、pCOLADuet、およびpACYCDuet (EMD Millipore) から生成した。pET15b、pCOLADuet、およびpACYCDuetプラスミドは全て、構成的に発現されるlacI遺伝子、T7 RNAポリメラーゼプロモーターおよびターミネーターペア、ならびに以下のそれぞれの耐性マーカー/複製起点: アンピシリン/ColE1、カナマイシン/ColA、およびクロラムフェニコール/P15Aを含有する。pET15b骨格を使用して本明細書に提示される全てのトリガーRNAを発現させ、pCOLADuetまたはpACYCDuet骨格のいずれかを使用してスイッチmRNAを発現させた。骨格のためのリバースプライマーを、T7プロモーターの上流の領域に結合するように設計した。トリガー骨格のためのフォワードプライマーを、T7プロモーターの先頭から増幅させた。スイッチ骨格のためのフォワードプライマーを、GFPmut3b-A5VまたはmCherryのいずれかの5'末端のプライミングをオフにし、Gibsonアセンブリーのためのリンカーを含有する30 nt配列を付加するように設計した。構築物をDH5 $\alpha$ 内部でクローニングし、配列決定して全てのトーホールドスイッチコンポーネントが正確に合成されたことを確保した。全ての形質転換は、確立された化学形質転換プロトコル (Inoue et al., Gene, 96:23-28, 1990) を使用して実施した。

## 【0135】

フローサイトメトリー計測および分析。フローサイトメトリーは、ハイスループットサンプラーを備えるBD LSRFortessa細胞分析装置を使用して実施した。GFP蛍光強度は、488nmの励起レーザーおよび530/30nmフィルターを使用して計測した。mCherry蛍光強度は、561nmレーザーおよび610/20nm発光フィルターを使用して計測した。典型的な実験において、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に約65倍だけ希釈し、96ウェルプレートからサンプリングした。前方散乱(FSC)をトリガーに使用し、約30,000個の個々の細胞を分析した。

## 【0136】

オン状態およびオフ状態細胞の蛍光計測についての誤差レベルは、少なくとも3つの生物学的レプリケートからの計測の標準偏差から計算した。次いで、オン/オフ蛍光比についての相対誤差レベルを、オンおよびオフ状態蛍光の相対誤差を四重で付加することにより決定した。インビボシステムクロストークの計測のため、676個の形質転換細胞の株のそれぞれの単一コロニーを、フローサイトメトリーを使用して計測した。これらの株についてのGFP出力のコロニー間の変動を推定するため、本発明者らは、ランダムに選択された18個の形質転換体のサブセットを計測し、それらを六重で計測した。これらの計測についての相対不確か率は、平均して12%であり、それはライブラリーコンポーネントについてのオン/オフ蛍光比を決定するために使用されたフローサイトメトリー実験について得られた不確か率と同等である。

## 【0137】

コロニー蛍光イメージング。大腸菌(E.coli)コロニーからの蛍光の画像は、Typhoon FLA 9000生体分子イメージングシステムを使用して得た。全ての画像は、同一のPMT電圧、0.1mmのイメージング分解能、473nmのレーザー励起、およびGFPの検出のためのLPB(>510nm長パス)フィルターを使用して得た。誘導細胞を、それらをプレーティングして約18時間後にイメージングした。IPTGはGFPと同一のチャンネルで低レベルの蛍光を示すため、プレート中のLB/寒天の厚さの変動は、バックグラウンド蛍光レベルの変動をもたらす。この効果を補うため、それぞれのプレート上で計測された最小のGFP強度を、プレート全体の強度レベルから差し引き、それによりほとんどのバックグラウンドIPTG蛍光を除去した。

## 【0138】

結果

本明細書において、タンパク質翻訳の転写後活性化を可能とする新たなリボレギュレーターのシステムが提供される。従来のリボレギュレーターとは異なり、本発明の合成リボレギュレーターは、トーホールド媒介直鎖-直鎖相互作用を利用してRNA-RNA鎖置換相互作用を開始させる。さらに、これらはスタートコドン周囲の領域の封鎖に依存してタンパク質翻訳を抑制し、翻訳を妨害するRBSまたはスタートコドン自体へのいかなる塩基対形成も回避される。結果として、これらのリボレギュレーターは、実質的に任意の配列を有するトリガーRNAに応答してタンパク質翻訳を活性化するように設計することができ、コンポーネントオルソゴナル性のかなりの改善を可能とする。RBSへの結合の不存在および熱力学的に好ましい直鎖-直鎖相互作用の使用は、RBSエンジニアリングを介する翻訳効率の容易な調整も可能とする。結果的に、これらのシステムは、2桁を超えるタンパク質発現のモジュレーションを定型的に可能とする。これらの相互作用機序の準デジタルシグナルプロセッシング挙動に基づき、これらのリボレギュレーターシステムは本明細書においてトーホールドスイッチと称される。

## 【0139】

本開示は、規定のトリガーRNAに応答してタンパク質産生を100倍超だけ増加させる多数の翻訳アクチベーターを大腸菌(E.coli)中で検証することにより、トーホールドスイッチの有用性をさらに実証する。さらに、本発明者らは、新規リボレギュレーター設計により提供される拡大RNA配列スペースを利用して前例のない部分オルソゴナル性を有するコンポーネントのライブラリー、例として、セット全体にわたり12%未満のクロ

10

20

30

40

50

ストークを示す26個のシステムのセットを構築し、それは全ての従来のオルソゴナルレギュレーターライブラリーのサイズを3倍超だけ超過する。トーホールドスイッチの配列および熱力学的分析は、新たなリボレギュレーターをフォワードエンジニアリングするために使用することができる設計原理のセットを生じさせる。これらのフォワードエンジニアリング型部分は、平均して、純粋な合理的設計枠組みから構築されるコンポーネントを使用してタンパク質ベース遺伝子ネットワークについて典型的に確保されるダイナミックレンジである400を超過するオン/オフ比を示す。

#### 【0140】

トーホールドスイッチ設計。トーホールドスイッチシステムは、スイッチおよびトリガーと称される2つのプログラミングされたRNA鎖から構成される(図17B)。スイッチmRNAは、調節される遺伝子のコード配列を含有する。このコード配列の上流に、強力なリボソーム結合部位およびスタートコードンの両方に続き、目的遺伝子のN末端に付加されるアミノ酸をコードする短いリンカー配列を含有するヘアピンベースプロセシングモジュールが存在する。ヘアピンモジュールの5'末端における一本鎖トーホールド配列は、トリガーRNA鎖のための初期結合部位を提供する。このトリガーモジュールは、RBSおよび開始コードンを露出するヘアピンとの分岐点移動プロセスを完了させ、それにより目的遺伝子の翻訳の活性化を引き起こす一本鎖RNAである。

#### 【0141】

ヘアピンプロセシングユニットは、トリガー鎖の不存在下で翻訳のリプレッサーとして機能する。従来のリボレギュレーターとは異なり、RBS配列は、ヘアピンの11ntループ内で完全に対形成しないままである。代わりに、開始コードンの直前および直後の塩基が、それぞれ6および9塩基対長であるRNA二本鎖内で封鎖される。スタートコードン自体は、本発明者らが試験したスイッチ中で対形成しないままであり、18ntヘアピンシステムの間点付近で3ntのバルジを残す。抑制ドメインb(図17B)はスタートコードンに相補的な塩基を有さないため、次いでコグネートトリガー鎖が対応するスタートコードン塩基を含有する必要がなく、それにより潜在的なトリガー配列の数を増加させる。スタートコードン後に付加されるヘアピン配列の配列を、ストップコードンの存在についてもスクリーニングした。それというの、それらは、リボレギュレーターが活性化される場合に目的遺伝子の翻訳を早期に終結させるためである。抑制トーホールドスイッチmRNAからのGFP発現の試験により、未抑制GFPmRNAと比較して98%以上の典型的な抑制レベルが明らかになった。この設計による良好な翻訳抑制を裏付けた後、本発明者らは、ヘアピンの5'末端において12ntトーホールドドメインを用いてそれとコグネートトリガー鎖との相互作用を開始させた。トリガー鎖は、スイッチmRNA中の初期塩基に完全に相補的な30nt一本鎖RNAを担持する。

#### 【0142】

この塩基トーホールドスイッチ設計から、本発明者らは、NUPACK核酸配列設計パッケージ(Zadeh et al., J. Comput. Chem. 32:170-173, 2011)を使用して翻訳アクチベーターのライブラリーを生成した。共通の21nt配列を使用してスイッチmRNAのヘアピンモジュールを目的遺伝子のコード配列に結合させた。このリンカー配列は、この場合、GFPレポーターであるように選択される目的遺伝子のフォールディングに対するその影響を最小化するために低分子量アミノ酸をコードするようにプログラミングした。計算負荷を低減させるため、GFPの最初の29ntのみを二次構造分析のために考慮した。しかしながら、完全なトリガー転写物は、設計プロセスの間にシミュレートした。この転写物は、T7RNAポリメラーゼプロモーターからの効率的な転写を促進するためのGGGリーダー配列、RNA安定性を増加させるための5'ヘアピンドメイン、および転写物の3'末端における47nt T7RNAポリメラーゼターミネーターを含んだ。NUPACKを使用し、規定の二次構造を満たし、特定のRBSおよびターミネーター配列を有するトーホールドスイッチ設計を生成した。設計中の未特定塩基はランダムであり、したがって、4つのRNA塩基のいずれかであることを可能とし、一部の配列制約をNUPACKに適用して同一塩基のランの伸長を除外した。本発明者らは、インビボ性能を測るために2

10

20

30

40

50

4 個のトーホールドスイッチのセットを設計し、それらを方法の項に記載のとおり構築した。多数のこれらのスイッチが高いダイナミックレンジを示すことを裏付けた後、本発明者らは最初に、ライブラリーの残りとの低いクロストークについて選択されるエレメントを含有するトーホールドスイッチの拡張ライブラリーの設計に着手した。

#### 【0143】

このライブラリーを生成するため、ランダム化配列を有する合計 672 個のトーホールドスイッチ設計を、NUPACK を使用して生成した。得られた設計のうち、25 個がスタートコドン後のヘアピン領域中でストップコドンをコードすることが見出された。残りのシステムにおいて、1 つの二重設計が見出され、646 個の特有のリボレギュレーター設計がライブラリー中で残った。

#### 【0144】

次に、本発明者らは、大腸菌 (E.coli) 中の試験のため、最低レベルの意図されないリボレギュレータートリガークロストークを示すこれらのトーホールドスイッチ設計の 144 個のサブセットを選択した。クロストークについてのインシリコスクリーニングは、2 つの目的を果たした。第 1 に、得られたオルソゴナルレギュレーターのライブラリーは、インビボ翻訳を独立して調節するためのコンポーネントの大型セットを提供し得た。第 2 に、オルソゴナル性についてスクリーニングされたシステムは、考えられるトーホールドスイッチの配列スペースの大部分に必然的に及び、将来的なシステムの設計を与える。本発明者らは、417, 316 個の RNA-RNA 相互作用に対応する 646 個の完全なセットについてのリボレギュレーターとトリガー鎖との間のペアワイズ相互作用をシミュレートした。これらのシミュレーションは、任意の得られたリボレギュレータートリガー複合体の濃度およびそれらの二次構造を決定した。これらのリボレギュレータートリガー複合体中のトーホールドスイッチシステムのインテグリティを使用して意図されないトリガー活性化の可能性を決定した。それというのも、スタートコドン付近の二本鎖領域の破壊は、目的遺伝子の翻訳をもたらすためである。このシステムインテグリティメトリックを通して、本発明者らは、モンテカルロアルゴリズムを使用して予測される最低の正味システムクロストークを有する 144 個のトーホールドスイッチ設計を選択した。これは、同一の二次構造制約に従うランダム配列を有する 168 個の異なるコンポーネントから構成されるトーホールドスイッチライブラリーをもたらした。

#### 【0145】

コンポーネント検証。トーホールドスイッチを大腸菌 (E.coli) BL21 Star DE3 中で試験し、スイッチ mRNA を中コピープラスミド (ColA 起点) から発現させ、トリガー RNA を高コピープラスミド (ColE1 起点) から発現させた。両方の鎖の発現は、IPTG を使用して誘導し、T7 RNA ポリメラーゼを通して両方の RNA 種の産生をトリガーした。スイッチ性能の定量的評価を可能とするため、本発明者らは、110 分の半減期が報告されている ASV タグ化 GFPmut3b (Andersen et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:2240-2246, 1998) を蛍光レポーターとして使用した。これらの実験的条件において、スイッチおよびトリガー RNA を発現するプラスミドのコピー数の差は、それぞれのプラスミドから別個に発現された GFPmut3b-ASV の蛍光計測により決定されたとおり、スイッチ分子と比較して 6~8 倍過剰のトリガーをもたらした。

#### 【0146】

フローサイトメトリーを使用してトーホールドスイッチの性能を特性決定した。細胞を、IPTG の誘導後 1 時間の間隔において計測した。オン蛍光は、リボレギュレーターおよびそのコグネートトリガーにより形質転換された細胞について計測された一方、オフ蛍光は、リボレギュレーターおよびランダムに選択された非コグネートトリガーを含有する細胞から測定された。活性化および抑制トーホールドスイッチの両方からの蛍光ヒストグラムは、ほぼ完全に単一モードであり、細胞デジタル論理におけるそれらの潜在的な使用を強調する (データ示さず)。ヒストグラムからのモード蛍光値を使用してそれぞれのリボレギュレーター設計のオン/オフ比を計算した。図 17C は、オンおよびオフ状態の 3 つのトーホールドスイッチ (番号 2、3 および 5) から計測されたモード GFP 蛍光を示

す（スイッチのみが第1のバーであり、スイッチおよびトリガーが第2のバーであり、陽性対照が第3のバーである）。比較のため、GFPレポーターのための同一配列を含有するそれぞれのスイッチmRNAの未抑制バージョンも陽性対照として評価した。スイッチのオフ状態蛍光は、GFPを発現しない誘導細胞について計測されるほぼバックグラウンド蛍光レベルである。活性化トールホルドスイッチについてのオン状態蛍光は、陽性対照と同等であり、ほぼ全てのスイッチmRNAがそれらのトリガーRNAにより結合したことを示す。

#### 【0147】

システムの活性化は、誘導1時間以内に観察され、経時的に増加し、GFPが蓄積した（図17D、挿入図）。図17Dは、ランダム配列ライブラリー中の168個全てのスイッチについて誘導3時間後に決定されたオン／オフモードGFP蛍光比を提示する。試験されたシステムのうち、20個が100を超過するオン／オフ比を示し、ほぼ三分の二が少なくとも10を超えるオン／オフを示す。比較において、本発明者らは、広く使用されるエンジニアリング型リボレギュレーターcrRNA10および12（Isaacs et al., Nat. Biotechnol. 22:841-847, 2004により記載）も同一条件において特性決定した。これらの早期のリボレギュレーションシステムは、顕著に低いダイナミックレンジを示し、crRNAシステム10および12についてそれぞれ $11 \pm 2$ および $13 \pm 4$ のオン／オフ値であった。

#### 【0148】

トールホルドスイッチオルソゴナル性の評価。翻訳アクチベーターのオルソゴナル性を評価するため、本発明者らは、144個のオルソゴナルコンポーネントライブラリーから上位35個のリボレギュレーターを選択し、追加のインシリコスクリーニングを実施し、ステムインテグリティおよび非コグネートトリガー鎖とスイッチ鎖との不所望な結合の両方に関して極端に低いレベルのクロストークを示す26個のサブセットを単離した。次いで、26個のリボレギュレーター間のペアワイズ相互作用を、大腸菌（E.coli）中で、細胞をリボレギュレーターおよびトリガープラスミドの676個全ての組合せにより形質転換することによりアッセイした。図18Aは、LBプレート上で誘導された大腸菌（E.coli）のコロニーからのGFP蛍光の画像を示す。オルソゴナルスイッチのセットを、図17Dにおいて計測された減少するオン／オフ蛍光比の順に示す。コグネートスイッチおよびトリガーペアからの強力な発光が格子の対角線に沿って明確に可視的であり、指数26における最後のスイッチは、その低いオン／オフ比の結果としてより低い蛍光を示す。対照的に、非コグネートトリガー／スイッチRNAペアを特徴とする非対角エレメントについては低い蛍光レベルが観察される。

#### 【0149】

定量的情報を得るため、本発明者らは、フローサイトメトリーを使用して全てのペアワイズトリガー／スイッチ相互作用からのGFP出力を計測した。クロストークは、非コグネートトリガーおよび所与のスイッチmRNAから得られたGFP蛍光をトリガーされた状態のスイッチの蛍光により割ることにより計算した。得られたクロストーク相互作用のマトリックスを図18Bに示す。定義により、対角線に沿ったクロストークレベルは100%である一方、非対角線のものは、コロニー画像からの定量的出力レベルと一致する。これらのデータに基づき、トールホルドスイッチは、前例のないオルソゴナル性の程度を示し、試験された26個のレギュレーターのフルセットは、12%未満のクロストークを示す。オルソゴナルセットにおけるレギュレーターの数は、その閾値クロストークレベルにより定義されるため、本発明者らは、異なるクロストーク閾値の範囲についてのオルソゴナルサブセットを同定した。例えば、トールホルドスイッチの18個のサブセットは、2%未満のサブセット広域クロストークを示す。

#### 【0150】

所与の用途についてトールホルドスイッチを選択する場合、それらの性能を評価するための潜在的により関連するメトリックは、閾値クロストークレベルの逆数である。翻訳アクチベーターについて、このパラメータは、スイッチのセットを使用して本発明者らのG

10

20

30

40

50

F P m u t 3 b - A S V レポーターと類似の出力特性を有するタンパク質を調節する場合、その間で予測すべき最小の倍数変化を表す。図 1 8 C は、トーホールドスイッチおよびいくつかの他の R N A ベースレギュレーターについての最大オルソゴナルサブセットサイズに対するこのライブラリーダイナミックレンジメトリックをプロットする。最大の従来報告されるオルソゴナルリボレギュレーターセットは、7 つの転写アテニュエーターからなるものであり、2 0 % のクロストークを示す (Takahashi et al., Nucleic Acids Res., 2013)。そのライブラリーについて、2 0 % のクロストークは、5 のその全ダイナミックレンジの上限をもたらず (図 1 8 C)。より早期のオルソゴナル翻訳アクチベーターおよびリプレッサーは、2 0 % のクロストークにおいてそれぞれ 4 つ (Callura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:5850-5855, 2012) および 5 つ (Mutalik et al., Nat. Chem. Biol. 8:447-454, 2012) のセットに限定されている。タンパク質について、約 3 0 % の 5 つのオルソゴナル真核転写因子クロストークのエンジニアリング型ライブラリーも報告された (Khalil et al., Cell 150:647-658, 2012)。本発明者らの認識によれば、本明細書において提供されるスイッチは、これまで報告された R N A またはタンパク質ベースのオルソゴナル調節エレメントの最大のセットを構成する。さらに、従来報告されたライブラリーと同等サイズのオルソゴナルトーホールドスイッチのサブセットは、従来報告されたシステムよりも一桁超大きい最小のダイナミックレンジを示す。

#### 【0151】

コンポーネント分析およびフォワードエンジニアリング。トーホールドスイッチからのフローサイトメトリーデータは、リボレギュレーター性能の配列依存性変動を決定する実質的なデータセットを提供した。配列依存性効果について粗いスクリーンの結果、本発明者らは、リボレギュレーター鎖のステム中のトップおよびボトムにおける塩基対形成に応じたトーホールドスイッチ出力の調査に着手した (図 1 9 A)。本発明者らは、これらの領域中の塩基対形成の強度が、ヘアピンの抑制強度に対する強力な効果を有することを仮定した。それというのも、それらはスタートコドンの封鎖に不可欠であり、それらはリボレギュレーターが活性化されると R B S および m R N A 領域の二次構造にも影響し得、次いで翻訳効率に影響するためである (Kudla et al., Science 324:255-258, 2009)。ヘアピンモジュール中のトップおよびボトムの 3 塩基対の分析により、それらの領域中の G - C 塩基対含量に応じたリボレギュレーターのオン / オフ比の顕著な変動が明らかになった。図 1 9 B は、2 つのステム領域中の G - C 含量の考えられる 1 6 個全ての順列について得られた平均オン / オフ蛍光、および特定の G - C 条件を満たすそれぞれのトーホールドスイッチについて得られたオン / オフ値を示す。ライブラリーのサイズおよびインシリコ設計の間に課される二次構造制約に基づき、いくつかの G - C 順列が 1 つのみまたは 2 つの代表的なトーホールドスイッチを有した。ステムのトップおよびボトム領域においてそれぞれ 0 および 2 つの G - C 塩基対を含有するトーホールドスイッチは、1 5 4 の平均オン / オフ蛍光比を示し、次に高い順列よりも 3 倍超高かった。平均オン / オフレベルは、G - C 組合せがこの組合せから離れて逸脱するにつれて安定して減少する傾向もあった。

#### 【0152】

リボレギュレーターステムのトップにおける低い G - C 含量への偏りは、結合リボソームと、活性化リボレギュレータートリガー複合体中のその付近の R N A 二本鎖との間の潜在的な相互作用を示唆した。特に、R N A 二本鎖の末端における弱い塩基対形成は、二本鎖の開放を可能とし得、R B S の上流の塩基を自然にフリーにし、リボソーム結合を促進する。この効果を調査するため、本発明者らは、R N A 二本鎖と、R B S 配列の開始点との間のヌクレオチドとして定義されるプレ R B S 領域 (図 1 9 A) のサイズを調整するために異なるヘアピンループサイズを有する一連のリボレギュレーターを試験した。ループバリエントリボレギュレーターの計測は、プレ R B S 領域を A リッチ配列の付加を通してサイズを 3 n t から 1 9 n t に増加させた場合にオン状態蛍光出力の定常増加を実証した (データ示さず)。特に、オン状態発現のこれらの増加は、プレ R B S 配列が、2 1 n t のループに対応する 1 3 n t 長になるまでシステムのオフ状態の対応する増加をもたらさなかった。これらの観察は、R B S のすぐ上流に配置された A / U 塩基を通しての翻訳

向上を実証した従来の研究と一致する (Vimberg et al., BMC Mol. Biol. 8:1-13, 2007)。さらに、これらは、ヘアピンループの長さを増加させることにより、トーホールドスイッチダイナミックレンジを増加させる容易な手段を提供した。トリガーRNA長に応じたトーホールドスイッチ挙動の体系的試験も実施した。これらの試験は、システムのオン／オフ比と、トーホールドドメインの長さとの間の強い正の相関を明らかにし（データ示さず）、スイッチ出力は、スイッチのステムを部分的に巻き戻すことのみにより増加させることができることを実証した（データ示さず）。

#### 【0153】

従来のリボレギュレーターは、その都度設計されており (Isaacs et al., Nat. Biotechnol. 22:841-847, 2004; および Callura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:5850-5855, 2012)、コンピュータ支援設計を利用するものは、一貫して高いオン／オフレベルを実証していない (Rodrigo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:15271-15276, 2012)。インビボで高い性能を示すようにフォワードエンジニアリングされるインシリコ設計リボレギュレーターは、新たな遺伝子回路の生成に要求される時間を顕著に低減させる潜在性を有し、次いでより複合的な細胞論理の実現を可能とする。結果的に、本発明者らは、上記知見を、高いダイナミックレンジのためにフォワードエンジニアリングされるトーホールドスイッチのセットについての設計に統合した。本発明者らのフォワードエンジニアリング型システムは、同一の一般二次構造および相互作用機序の168個のトーホールドスイッチのライブラリーを保持するが、それらのダイナミックレンジを顕著に改善するために上記見識のいくつかを採用する。第1に、本発明者らは、図19Bにおいて明らかにされたスイッチmRNA配列制約の組合せを取り込んだ。具体的には、ヘアピンステムのトップ3塩基を弱いA-U塩基対に制限した。ステムのボトム3塩基対を、2つの強力なG-C塩基対および1つのA-U塩基対を含有するように特定した。第2に、本発明者らは、スイッチトーホールドの長さを12ntから15ntに増加させた。この変化は、トリガーとスイッチとの間の初期結合を強化した。第3に、本発明者らは、ヘアピンループのサイズを11ntから15ntに増加させてスイッチ活性化時の出力タンパク質の翻訳を向上させた。本発明者らは、かなり保存的な15ntのループサイズを選択してオフ状態のシステムからのリークを低いままであることを確保した。最後に、本発明者らは、スイッチシステム中の18塩基の最初の15塩基のみを巻き戻すコグネートトリガーを活用した。この設計変化は、多数の利益を生じさせた。それは、全てAおよびU塩基に特定されるヘアピンステム中のトップ3塩基へのトリガーRNAの結合を回避することを可能とし、それによりトリガーについての対応する配列制約を排除し、その長さを30ntにおいて不変のままとする。さらに、ステムのトップの3つの弱い塩基対の破壊の回避は、ステム中のより下方の塩基が巻き戻された後にそれらが自然に開放することを可能とする。この設計変化は、オフ状態リークを同時に増加させずに3nt A/Uエンハンサーエレメントを付加することによりプレRBS領域のサイズを効率的に増加させた。

#### 【0154】

本発明者らは、NUPACKを用いて上記の4つのシステム改変を有する13個のフォワードエンジニアリング型トーホールドスイッチを設計した。図19Cは、誘導3時間後にGFPを調節するフォワードエンジニアリング型翻訳アクチベーターについてのオン／オフモード蛍光比を提示する。試験されたほぼ全てのシステムについてオン／オフ蛍光の大幅な増加が存在し、13個のうち12個が、初期ライブラリーからの最大性能トーホールドスイッチと同等のまたはそれよりも高いダイナミックレンジを示す。これらのフォワードエンジニアリング型システムは、初期トーホールドスイッチ設計についての43と比較して406の平均オン／オフ比を示す。この平均オン／オフ比は、高度にプログラマブルなシステム設計を使用し、いかなる進化も大規模スクリーニング実験も要求せずにタンパク質ベースの調節システムのダイナミックレンジに匹敵する。さらに、最低性能を示す最適化トーホールドスイッチでさえ、多くの細胞運命決定演算に依然として十分な33±4のオン／オフ比を示した。時間単位の経時的計測により、誘導1または2時間後のフォワードエンジニアリング型スイッチの活性化が明らかになった（図19C、挿入図）。さ

らに、オン状態蛍光は、4時間にわたり着実に増加し、両方のスイッチについて600超ものオン／オフレベルを生じさせた。

#### 【0155】

本発明者らは、所与の最小レベルを超過するオン／オフ比を有するフォワードエンジニアリング型設計の割合を計算し、それらをランダム配列を有する168個のトーホールドスイッチのライブラリーに対して実施された同一の計算と比較することにより、本発明者らのフォワードエンジニアリング方針の有効性を定量した(図19D)。高性能スイッチの収穫は、試験された全てのオン／オフ比についてフォワードエンジニアリング型スイッチが高い。例えば、フォワードエンジニアリング型設計の92%が、ランダム配列ライブラリーの168個からの単一のスイッチと比較して少なくとも287のオン／オフGFP 10  
蛍光を有した。

#### 【0156】

システム性能の熱力学的分析。本発明者らのフォワードエンジニアリングは、92%の高いダイナミックレンジの可能性を有するリボレギュレーターをもたらした。リボレギュレーター活性の予測モデルを開発するため、ランダム配列を有する168個の初期スイッチのオン／オフ比を、6つの異なるカテゴリーに分類される多数の熱力学的パラメータに関して分析した(図20A)。オンおよびオフ状態単独における蛍光出力とは対照的なオン／オフ比を、定量分析に使用した。それというのも、蛍光オフ状態は、ライブラリーにわたり相対的にほとんど変動せず、オン／オフ比が本質的にオン状態蛍光の尺度のままであるためである。Salis et al., Nat. Biotechnol. 27:946-950, 2009による処理後、発現タ 20  
ンパク質pの量は、式 $p \propto \exp(-k \Delta G)$ (式中、kは、フィッティングパラメータである)を通して熱力学的自由エネルギーに関連付けることができる。結果的に、熱力学的パラメータとリボレギュレーターオン／オフ値との間の関係は、自由エネルギー対オン／オフ比の片対数プロットに適用される線形回帰の決定係数 $R^2$ により評価することができる。しかしながら、熱力学的パラメータのそれぞれは、フルコンポーネントライブラリーに適用された場合、リボレギュレーター出力特性とのいかなる有意な相関も実証し得なかった。

#### 【0157】

図19Bにおいて観察された配列依存性効果に基づき、本発明者らは、熱力学的パラメータと、類似配列特性を共有するトーホールドスイッチのサブセットとの間の関係の探索 30  
に着手した(図20A、データ示さず)。多数のスイッチサブセットについての $R^2$ 値を調査することにより、本発明者らは、システム出力との明確な相関を示す単一パラメータ $\Delta G_{RBS}$ リンカーを同定した。 $\Delta G_{RBS}$ リンカーは、リボレギュレータートリガー複合体のRNA二本鎖のすぐ下流から開始し、ヘアピンモジュール後に付加された共通の21ntリンカーの末端に続く領域の二次構造に伴う自由エネルギーである(図20B)。これは、リボソームが結合し、出力遺伝子の翻訳を開始する場合にRBS／初期mRNA領域を巻き戻すためにリボソームにより要求されるエネルギーの量を反映する。翻訳効率の変動は、mRNA中の初期二次構造に既に関連付けられており、類似の熱力学的因子を用いて原核RBSの強度が計算されている(Salis et al., Nat. Biotechnol. 27:9 40  
46-950, 2009)。図20Cは、ステムのトップにおける弱いA-U塩基対をそれぞれ含有する68個のリボレギュレーターのサブセットについての $\Delta G_{RBS}$ リンカーとオン／オフ比との間の関係の一例を提供する。ライブラリーからのこのリボレギュレーターのセットは、 $\Delta G_{RBS}$ リンカーとの相関が $R^2 \geq 0.4$ で同定された最大のものであった。対照的に、ステムのトップにおける強力なGC塩基対を含有する100個のリボレギュレーターの相補的サブセットは、 $\Delta G_{RBS}$ リンカーとの相関を $R^2 = 0.024$ で示さず、待機部位におけるリボソームとの配列依存性相互作用の結果と考えられる。

#### 【0158】

$\Delta G_{RBS}$ リンカーの重要性を同定したため、本発明者らは次に、フォワードエンジニアリング型システムからのオン／オフレベルとその関係を調査した。本発明者らは、 $\Delta G_{RBS}$ リンカーがオン／オフレベルとのかなり強い相関を示すことを見出し、 $R^2$  50

= 0.79であった(図20D)。最も重要なことに、本発明者らは、この単一の熱力学的用語が、単一の低性能フォワードエンジニアリング型トーホールドスイッチを説明するために十分であることを見出した。この特定のトーホールドスイッチは、活性化されたスイッチmRNAの翻訳効率を顕著に減少させるRBS-リンカー中の比較的高度な二次構造を有した。

#### 【0159】

多重調節。トーホールドスイッチのオルソゴナル性は、それらが細胞内部で複数のタンパク質を同時に独立して調節することを可能とし得る。この能力を実証するため、本発明者らは、細胞を、それぞれA\*およびB\*により示される、スペクトルにより区別される蛍光タンパク質GFPおよびmCherryを発現する2つのオルソゴナルトーホールドスイッチmRNAを発現するプラスミドにより形質転換した(図21A)。次いで、これらのトーホールドスイッチのこれらのRNAのコグネートトリガーRNAを、レポーター発現との考えられる4つ全ての組合せにおいて発現させ、フローサイトメトリーを使用して定量した(図21B)。AまたはBトリガーいずれか単独の転写時、GFPおよびmCherry蛍光はそれぞれ1桁超だけ増加する一方、オルソゴナルチャネルにおける蛍光レベルは実質的に不変である。AおよびBトリガーRNA両方の同時発現は、この2つのトーホールドスイッチについて予測されるとおり、両方の蛍光団の発現の強力な増加を生じさせる。

#### 【0160】

機能mRNAによりトリガーされるトーホールドスイッチ。トーホールドスイッチ設計により提供される配列スペースは、それらが機能mRNAによりトリガーされることを可能とする(図21C)。しかしながら、これらのmRNAトリガーの固定配列は、効率的なシステム活性化について顕著な困難を提示する。完全に一本鎖であるように設計された合成トリガーRNAとは異なり、強力な二次構造がmRNA内に富み、トーホールド結合を妨害し、分岐点移動プロセスを推進するサーモダイナミクスを減少させる。トリガーmRNAにより定義されるトーホールド配列は、内部で、およびヘアピンモジュールの下流配列との両方で塩基対形成も示し、したがって、スイッチ活性化への類似の困難を提起し得る。これらの効果を克服するため、本発明者らは、mRNA応答スイッチのトーホールドドメイン長を12ntから $\geq 24$ ntに増加させた。この改変は、トリガーmRNAからトーホールドスイッチ自体への結合開始のための一本鎖領域の重要性のシフトを支援し、スイッチ中の下流配列のみが、結合領域とハイブリダイズし得る。さらに、本発明者らは、168システムライブラリーからの最大性能トーホールドスイッチの詳細な試験の間に同定された多数の設計特徴を活用した。トーホールドスイッチ番号1は、その完全な30ntコグネートトリガーRNAと対形成した場合、 $290 \pm 20$ のオン/オフ比を有した。本発明者らは、5'末端からトランケートされた短縮トリガーRNAを使用することによりオン/オフ比が急激に増加することを見出した。特に、本発明者らは、トーホールドスイッチ番号1は、そのステムのボトム5塩基のみを巻き戻すことが意図されるトリガーRNAに応答して $1900 \pm 200$ のオン/オフ蛍光を提供し得ることを観察した。トーホールドスイッチ番号1システムの二次構造および熱力学的分析は、この極端なダイナミックレンジが2つの要因に起因することを示した。第1に、スイッチ番号1のステムは、相対的に高い比率の弱いA-U塩基対を含有し、ステム中のG-C塩基対は、ステムのボトムに濃縮された。結果的に、トリガーはボトム5塩基対を破壊し、ステム中のG-C塩基対の半数が排除され、リボソーム結合に利用可能な主としてA-U塩基対を含有する弱いステムが残った。さらに、ステム中の下方塩基のみへのトリガー結合は、活性化スイッチのプレRBS領域を増加させ、翻訳の追加の向上を提供した。第2に、トリガー結合時にステムからフリーになった塩基は、スイッチリンカー領域中の下流塩基と相互作用し、弱いステムループを形成することが示された(データ示さず)。このリフォールディング機序は、破壊されるステムの追加の塩基をもたらし、それがその抑制強度をさらに弱め、トリガー結合へのエネルギー障壁を減少させた。

#### 【0161】

本発明者らは、上記の全ての設計特徴を取り込み、mRNAに応答性のトーホールドスイッチを生成した。スイッチヘアピンモジュールは、トーホールドスイッチ番号1配列に由来した。具体的には、スイッチ番号1ステムのトップ12塩基およびループを、全てのmRNAセンサー中で使用した(図21C)。さらに、センサーループのサイズを11ntから18ntに増加させてレポーター発現を増加させた。トーホールドおよびセンサーステムのボトム6塩基対は、トリガーmRNAと相互作用するようにプログラミングされた可変塩基を有した。24ntおよび30ntトーホールドを初期mRNA結合に使用し、ボトム6塩基対がトリガーにより巻き戻されるように特定した。トリガーmRNAによるステム巻き戻しへのエネルギー障壁を減少させるため、本発明者らは、上記の下流RNAリフォールディング機序もセンサー中に明確にコードした。これらのRNAリフォールディングエレメントは、スイッチステムのボトム4塩基対の破壊後に6bpステムループの形成を誘導し、次いでスイッチステム中の2つの追加塩基の破壊を強制した。この塩基トーホールドスイッチmRNAセンサー設計を使用して、本発明者らは、トリガーmRNAの全長に沿って考えられる全てのセンサーの二次構造およびサーモダイナミクスをシミュレートした。次いで、本発明者らは、インシリコスクリーニングを使用してセンサー二次構造およびmRNA結合部位利用可能性の最良の組合せを提供するトーホールドスイッチを同定した。

10

#### 【0162】

得られたmRNAセンサーを上記実験と同一の様式で試験し、トリガーmRNAは高コピーColE1起点ベクターから発現させ、GFPを調節するトーホールドスイッチは中コピーColA起点ベクターから発現させた。本発明者らは、外因性mRNAトリガーのmCherry、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(cat、クロラムフェニコール耐性を付与)、およびaadA(スペクチノマイシン耐性を付与)の三つ組をセンシング実験のために選択して内因性RNAによるスイッチ活性化の可能性を最小化した。mCherryトリガーRNAは、効率的な翻訳を可能とするためのRBS領域を特徴とした一方、2つの抗生物質耐性を付与するmRNAは、リボソームによる翻訳がトーホールドスイッチの認識および結合を妨害し得たため、RBSを欠いた。図21Dは、5つのトーホールドスイッチから計測されたオン/オフGFP蛍光を提示する。翻訳可能なmCherry mRNAによりトリガーされた3つのセンサーは、最も強力な活性化を提供し、設計Aは、 $57 \pm 10$ の最良のオン/オフ比を示す。非翻訳可能mRNAによりトリガーされたトーホールドスイッチは、より小程度の約7倍の活性化レベルを示した。

20

30

#### 【0163】

トリガーmRNAからの翻訳に対するトーホールドスイッチ結合の効果を確立するため、本発明者らは、mCherryセンサーの存在または不存在下でmCherry出力を計測する実験も実施した。図21Eは、活性化細胞から計測されたmCherry蛍光に加え、活性および抑制状態の3つのmCherry応答性スイッチについて計測されたGFPの蛍光を含有する。比較のため、対照実験から得られた蛍光計測も提示し、それは非誘導細胞から計測されたバックグラウンドGFP蛍光ならびにそれぞれColAおよびColE1起点ベクターからのGFPおよびmCherryの非調節発現から計測された蛍光を示す。mCherryの発現は、トーホールドスイッチRNAの転写により強力に影響を受けない。このことは、トリガーとスイッチとの間の結合が、リボソームによる翻訳を阻害しないことを示唆するが、本発明者らの実験においてスイッチと比較してモル過剰のトリガーRNAがこの効果の強度を減衰させる。活性化スイッチからのGFP発現レベルは、2.5倍のみの範囲内で変動する一方、抑制スイッチからのリークは、約5倍だけ変動する。このリークの変動は、mCherryセンサーのオン/オフレベルの変動を説明する決定因子であり、mRNAセンサーのための親設計のように高度に感受性の親トーホールドスイッチの使用に起因する。

40

#### 【0164】

考察

50

トーホールドスイッチは、転写後レベルにおいて翻訳を調節するための多用途および強力な新たなプラットフォームを表す。これらは、前例のないコンポーネントオルソゴナル性の程度と、広く使用されるタンパク質ベース調節エレメント 22 と同等のシステムダイナミックレンジとを組み合わせる。インビボスイッチトリガーペアワイズ相互作用の包括的評価は、12%未満のクロストークレベルを有する26個のトーホールドスイッチのセットをもたらした。本発明者らの認識によれば、このことは、これまで報告されたオルソゴナル調節エレメントの最大ライブラリーを表し、従来のライブラリーをサイズにおいて3倍超だけ超過する (Takahashi et al., *Nucleic Acids Res.*, 2013)。現時点において、トーホールドスイッチのオルソゴナルセットの最終的なサイズは、本発明者らのクロストークアクセイのスループットにより限定され、リボレギュレーター固有の設計特徴によ

10

#### 【0165】

インビボでの翻訳抑制およびRNA-RNA相互作用の開始についての新たな機序の採用は、これらの前進に不可欠であった。トーホールドスイッチは、RBSおよび一部の場合においてスタートコドンへの接近を遮断することにより抑制する従来のリボレギュレーター (Isaacs et al., *Nat. Biotechnol.* 22:841-847, 2004; Rodrigo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:15271-15276, 2012; および Mutalik et al., *Nat. Chem. Biol.* 8:447-454, 2012) とは対照的に、それらのオフ状態で、RNA二本鎖内の調節される遺伝子の開始コドン付近の配列を封鎖することにより翻訳を強力に抑制する。早期のリボレギュレーターがループ直鎖 (Isaacs et al., *Nat. Biotechnol.* 22:841-847, 2004; および Mutalik et al., *Nat. Chem. Biol.* 8:447-454, 2012) およびループループ (Lucks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:8617-8622, 2011; Rodrigo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:15271-15276, 2012; および Takahashi et al., *Nucleic Acids Res.* 2013) 相互作用に依存している一方、トーホールドスイッチは、トーホールド媒介直鎖直鎖RNA相互作用を活用してリボレギュレーター-mRNAとトリガーRNAとの間の結合を開始させる。まとめると、これらの演算機序は、トーホールドスイッチがほぼ任意の配列を有するトリガーRNAを受容することを可能とし、オルソゴナル演算のための配列スペースを大幅に拡大し、それらは12から15 nt 長の伸長トーホールドドメインを使用することによりRNA-RNA相互作用を高反応キネティクスで促進する。早期の報告とは対照的に、トーホールドスイッチ性能の熱力学的分析は、リボレギュレーターオン/オフレベルと、リボレギュレータートリガー相互作用の自由エネルギー、トーホールドトリガー結合の自由エネルギーとの間の有意な相関を明らかにしなかった Mutalik et al., *Nat. Chem. Biol.* 8:447-454, 2012)。これらの観察は、トーホールドスイッチについてのRNA-RNA相互作用が熱力学的および動力学的に強く好ましいことを示唆する。

20

30

#### 【0166】

本発明者らは、本発明者らのトーホールドスイッチのダイナミックレンジの増加が3つの主因によると考える。第1に、トリガー-スイッチ相互作用を推進するキネティクスおよび熱力学的自由エネルギーの増加は、細胞中に存在するより高い割合の全スイッチmRNAがトリガーされて出力産生を産生することを引き起こす。本発明者らは、活性化スイッチmRNAの率が、スイッチmRNAの非抑制バージョンによる比較計測に基づき約100%であることを見出した (図17C)。第2に、RBSの塩基をステム内で封入しないトーホールドスイッチの設計は、調節される遺伝子の最適な発現のためにRBSおよびその包囲塩基をエンジニアリングするかなり良好なプラットフォームを提供する。トーホールドスイッチmRNAのループサイズを変動させる実験は、スイッチのオン状態蛍光と、RBSの上流のより長いアリッチ領域の存在との間の極めて強力な依存性を実証した (データ示さず)。重要なことに、このRBS向上は、ループ領域に付加すべき追加の塩基のみを要求し、トリガーRNAの配列の対応する変化を要求しなかった。対照的に、多く

40

50

の従来のリボレギュレーターシステムについては、類似のRBSエンジニアリングは、リボレギュレーターRNAの両方のペアに改変を行うことを要求し、設計を複雑化し、結果を適切に解釈するためのRBSおよびRNA-RNA相互作用からの効果の解析を要求する。最後に、トーホールドスイッチは、インシリコで設計してほとんど二次構造を有さないRBSおよび初期mRNA領域を提供して調節される遺伝子の効率的な翻訳を促進した。これは、追加の塩基およびリンカーを出力遺伝子のN末端に付加することにより達成したが、mRNA二次構造に関する最適なコドンを選択するためのアルゴリズムを使用してN末端塩基の付加なしでトーホールドスイッチを産生することができる。同義語コドンも、スイッチの制限されるこのようなN末端の大型オルソゴナルセットの構築を可能とするはずである。

10

【0167】

本明細書に記載の種々のリボレギュレーターについての配列：

【0168】

【表1】

表1. 24個のランダム配列トーホールドスイッチの初期セットからのあるトーホールドスイッチおよびトリガーについての配列および性能情報。

| トーホールド<br>スイッチ<br>番号 | スイッチ配列                                                                                                              | トリガー配列                                                                               | オン/オフ        |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4                    | GGGAAUUGAUUUGUGAUUAUGU<br>GAUGAUUGUAAACAGAGGAGAU<br>CAAUAUGCACAUAAUCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号1)   | GGGACAUACGGACUCACGUGUC<br>CGUAUGUCAAUACAAUCAUCAC<br>AUAUACACAAUAUCAAUUACU<br>(配列番号2) | 264.6 ± 19.9 |
| 10                   | GGGAAUUGAUUUGUUCGUUUCG<br>UAUGAUCUAAGACAGAGGAGAUU<br>AGAUUAUGACGAAACGAAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号3) | GGGACAUACGGACUCACGUGUC<br>CGUAUGUAACUUAGAUCAUACG<br>AAACGAACAAUAUCAAUUACU<br>(配列番号4) | 192.4 ± 26.9 |
| 14                   | GGGAAUUGAUUUGUAGUAUGUU<br>GAAGUGAUUGAACAGAGGAGACA<br>AUCAAUGCAACAUAACUACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号5)  | GGGACAUACGGACUCACGUGUC<br>CGUAUGUCAGCAAUCACUUCAA<br>CAUACUACAAUAUCAAUUACU<br>(配列番号6) | 153.4 ± 10.1 |

20

30

【0169】

【表 2】

表2. 144個のオルソゴナルランダム配列トールドスイッチのセットからのあるトールドスイッチおよびトリガーについての配列および性能情報。

| トールド<br>スイッチ<br>番号 | スイッチ配列                                                                                                                | トリガー配列                                                                                 | オン/オフ        |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1                  | GGGUGAAUGAAUUGUAGGCUUGU<br>UAUAGUUAUGAACAGAGGAGACA<br>UAACAUGAACAGCCUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号7)    | GGGACCGUGGACCGCAUGAGGU<br>CCACGGUAAACAUAACUAUAAC<br>AAGCCUACAAUUCUAUCAAAC<br>(配列番号8)   | 292.0 ± 19.5 |
| 2                  | GGGUUAUAAGUAAAUCGCUUGCUG<br>UAUGUCGUUAAACAGAGGAGAU<br>ACGAAUGACAGCAAGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号9)   | GGGAUGCCCGUAGUUCAUUUCUA<br>CGGGCAUGAAUAACGACAUACA<br>GCAAGCGAUUUACUUAUACUA<br>(配列番号10) | 279.6 ± 17.6 |
| 3                  | GGGUGAUGGAAUAAGGCUUGUUA<br>UAUGAUGUUAAGACAGAGGAGAU<br>ACAUUAUGAUACAGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号11)   | GGGUCAGUCCUGAGGUACCAG<br>GAACUGAAACUAACAUCUAUA<br>CACAGCCUUAUCCAUACACAC<br>(配列番号12)    | 265.3 ± 28.2 |
| 5                  | GGGUAGAUAUUGAAUGCUGCUGU<br>UAUGUCGUUAAACAGAGGAGAU<br>ACGAAUGAACAGCAGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号13)   | GGGACGCGAAUUCUAUCCAU<br>UUCGCGUGACUAACGACAUAA<br>AGCAGCAUUCAAUAUCUAAAC<br>(配列番号14)     | 253.0 ± 12.5 |
| 6                  | GGGAUAAGUAGAUAAGAUUGUUA<br>GAUGGCUUCGAACAGAGGAGACG<br>AAGCAUGCUAACAAUCAAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号15) | GGGUCGUGCGCUCUGAGCCGAG<br>CGCACGAGAACGAAGCCAUCUA<br>ACAAUCUUAUCUUAUUAUCAC<br>(配列番号16)  | 219.8 ± 16.5 |
| 7                  | GGGAUCACUUAUUGUCGUCUUUG<br>UAUGUCGUUAAACAGAGGAGAU<br>CAGAAUGACAAAGACGAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号17)   | GGGACGUCGAUUCACCGUCGAA<br>UCGACGUAGAUACAGACAUACA<br>AAGACGACAAUAAGUGAUAGA<br>(配列番号18)  | 213.3 ± 28.3 |
| 8                  | GGGACAAAGAUUGGUCGUUUCAU<br>UACCGUUAGAAACAGAGGAGAU<br>UAACAUGAAUGAAACGAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号19)   | GGGACUCCAGGCGGAAUAACGC<br>CUGGAGUAAAUCAACGGUAAU<br>GAAACGACCAAUUUUGUAUG<br>(配列番号20)    | 200.8 ± 13.5 |
| 9                  | GGGCGAAAGUGUAUGGCUGAUAU<br>GAUGUAGUUAACAGAGGAGAU<br>ACUAAUGCAUAUCAGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号21)    | GGGUCGCACGGUUCGCUAAC<br>CGUGCGAGAAUAACUAUCAU<br>AUCAGCCAUAACUUUCGAAC<br>(配列番号22)       | 194.4 ± 31.3 |
| 11                 | GGGUAGAUAUUGAUGGCUAUUUG<br>UACGUGUUCGAACAGAGGAGACG<br>AACAAUGACAAUAGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号23)   | GGGACCAUUCGCCCUAUUGGC<br>GAAUGGUAAGCGAACCGUACA<br>AAUAGCCAUCAAAUUUUAACU<br>(配列番号24)    | 181.2 ± 13.0 |
| 12                 | GGGAUUGGAUGAAGGCGGUAAG<br>UAUGAUUGUAGACAGAGGAGAU<br>CAAUAUGACUUACCGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号25)    | GGGUCCAGUCUAGACUGACCUA<br>GACUGGACAAUACAAUCAUACU<br>UACCGCCUUCAUCCAAUUAACU<br>(配列番号26) | 169.9 ± 16.7 |
| 13                 | GGGUAGAAUUUGAUACUUGAUUU<br>GAUGGCUUGAAACAGAGGAGAU<br>AAGCAUGCAAAUCAAAGAACUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号27)   | GGGUCUAAUGCGAGUAAAGUCG<br>CAUUAAGAAUAUCAAAGCCAUC<br>AUAAGUAUCAAUUAUUAAG<br>(配列番号28)    | 155.3 ± 8.6  |

【表 3】

| トーホールド<br>スイッチ<br>番号 | スイッチ配列                                                                                                                 | トリガー配列                                                                                  | オン/オフ        |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 15                   | GGGCGUUUAUACUUUGUCGUUCUG<br>CGUGUCGUUAAACAGAGGAGAUUA<br>ACGAAUGGCAGAACGAAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号29) | GGGACUGAGGUACCUCGAAGUA<br>CCUCAGUAGAUAAACGACACGCA<br>GAACGACAAAGUAUAACGAAA<br>(配列番号30)  | 124.7 ± 11.0 |
| 16                   | GGGUAAGAAUGAUAAAGGUAAGU<br>AGUGAGUUGAAACAGAGGAGAUU<br>AACUAUGUACUUACCUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号31)   | GGGCCAUGACUCCUAAUUCGGA<br>GUCAUGGAAAUCAACUCACUAC<br>UUACCUUUAUCAUUCUUACUU<br>(配列番号32)   | 123.2 ± 23.0 |
| 17                   | GGGCGAUAAAGACUGAGGCUGGG<br>UAUGGUUAGAAACAGAGGAGAUU<br>UAACAUGACCCAGCCUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号33)   | GGGCCUCGACGUUCGUGAUAAAC<br>GUCGAGGCAUUCUAACCAUACC<br>CAGCCUCAGUCUUUAUCGCAA<br>(配列番号34)  | 122.6 ± 0.8  |
| 18                   | GGGAUAGAUGAUUGUGCUUAGUU<br>UAUGAUUCUGAACAGAGGAGACA<br>GAAUAUGAAACUAAGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号35)   | GGGACAUCCUAAAGUUGACUCUU<br>AGGAUGUAAACAGAAUCAUAAA<br>CUAAGCACAAUCAUCUAUACA<br>(配列番号36)  | 115.1 ± 7.9  |
| 19                   | GGGAUAAUGAUGAUGAGUAUGUU<br>GAAGGUGUAAGACAGAGGAGAUU<br>ACACAUGCAACAUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号37)      | GGGUCGUGUGAUGCUAUCUCAU<br>CACACGACAAUUAACCUUCAA<br>CAUACUCAUCAUUAUACAC<br>(配列番号38)      | 103.5 ± 10.5 |
| 20                   | GGGCGUUAAUCUCUGGCUUGCUU<br>UAUGUCUGUAAACAGAGGAGAUUA<br>CAGAAUGAAAGCAAGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号39)  | GGGUCAUGACUGGGACACGCCA<br>GUCAUGAGAAUACAGACAUAAA<br>GCAAGCCAGAGAUUAACGAAG<br>(配列番号40)   | 101.9 ± 8.4  |
| 21                   | GGGUAAGAAUGAAACGCGUGAAU<br>GAUAGUAUUGAACAGAGGAGACA<br>AUACAUGCAUUCACGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号41)   | GGGUCACCUCAGGCACGACUG<br>GAGGUGAAUACAAUACUAUCAU<br>UCACGCGUUUCAUCUUUACUU<br>(配列番号42)    | 86.6 ± 14.5  |
| 22                   | GGGCAUUAAGAUUGUACUUGUAA<br>GAUCGUGUCGAACAGAGGAGACG<br>ACACAUGCUUACAAGUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号43)   | GGGACCUGAGCGGAGCGCAGUCC<br>GCUAGGUAAACGACACGAUCUU<br>ACAAGUACAAUCUUAUUGAAA<br>(配列番号44)  | 83.1 ± 2.0   |
| 23                   | GGGUAUGAAUUGAUGUCGAUUGU<br>UAUGUCUUGAGACAGAGGAGAUU<br>AAGAAUGAACAAUCGAAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号45)   | GGGACCCGACCGCGUCCUGGCG<br>GUCGGGUAAAUCAAGACAUAAAC<br>AAUCGACAUCAAUUCUAUACUA<br>(配列番号46) | 75.2 ± 4.9   |
| 24                   | GGGUAAGAAUGAGAACGCUUGUG<br>AAUGAUGUGAAACAGAGGAGAUU<br>ACAUUUGUCACAAGCGAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号47)   | GGGUCGGGACACGGGCAUACGU<br>GUCCCGACAAUCACAUCAUUA<br>CAAGCGUUCUACUUCUUACUU<br>(配列番号48)    | 74.8 ± 13.0  |
| 25                   | GGGUGAUAGAUGAAGGCAGGCGU<br>UAUAGUUUAGAACAGAGGAGACU<br>AAACAUGAACGCCUGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号49)   | GGGUCGUGGGCCUGCCUAAAGG<br>CCCACGAGAACUAAACUAUAAC<br>GCCUGCCUUCUACUUAUCAAAC<br>(配列番号50)  | 72.6 ± 3.7   |
| 26                   | GGGUAAGUAAUGAAGUCUAAGUG<br>UAUCGUGUCGGACAGAGGAGACG<br>ACACAUGACACUUAGAAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号51)   | GGGACGAACUUGAUCAAAUUCA<br>AGUUCGUAAACGACACGAUACA<br>CUUAGACUUCUUACUUAUACA<br>(配列番号52)   | 68.2 ± 10.3  |

10

20

30

40

【表 4】

| トーホールド<br>スイッチ<br>番号 | スイッチ配列                                                                                                                 | トリガー配列                                                                                | オン/オフ       |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 27                   | GGGAUAGAAUUAGAAAUGAAUA<br>GAUGGUUACGAACAGAGGAGACG<br>UAACAUGCUAUUUCAUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号53)    | GGGUCGCUUGUACUCUUGCGUA<br>CAAGCGAAAGCGUAACCAUCUA<br>UUUCAUUUCUAAUUCUAUCUA<br>(配列番号54) | 67.3 ± 10.7 |
| 28                   | GGGAUAGAAAUUGAUCGUUAGUU<br>UAUGUUGCCGGACAGAGGAGACG<br>GCAAAUGAAACUAACGAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号55)   | GGGUAUCUACUCGACUUCGCGA<br>GUAGAUAAAAGCGCAACAUA<br>CUAACGAUCAAUUUCUAUAAC<br>(配列番号56)   | 66.9 ± 8.0  |
| 29                   | GGGAGUUUGAAUUGGCGAAAUG<br>AAUGC UUUGAAACAGAGGAGAU<br>AAAGAUGUCAUUUCGCAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号57)    | GGGACGAGAGCUCCUAGCAGAG<br>CUCUCGUUAUCAAAGCAUUA<br>UUUCGCCAUUAUCAAACUAAC<br>(配列番号58)   | 63.1 ± 6.6  |
| 30                   | GGGUAAGAUGAUAAAGAUUGAG<br>UAAGGUAGUAAACAGAGGAGAU<br>CUACAUGACUCACAUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号59)      | GGGCACGACUAGAAACCGAUUC<br>AGUCGUGCAAUACUACCUUACU<br>CACAUCUUAUCAUCUUAUACU<br>(配列番号60) | 63.0 ± 5.6  |
| 31                   | GGGAUCUAAAUGUAUUCGUUCGU<br>UAUGGUUAUUGAACAGAGGAGACA<br>AUACAUGAACGAAACGAAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号61) | GGGCGUCGCGUUCGCGGUAAC<br>AGCGACGGAACAAUACCAUAAC<br>GAACGAAUACAUAUUGAUACU<br>(配列番号62)  | 62.0 ± 6.2  |
| 32                   | GGGUCAAUUUCGUUAUAGUAUGU<br>UAUGGUUCUGAACAGAGGAGACA<br>GAACAUGAACAUACUAAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号63)   | GGGACUCGGUCUCUAUGUCGAG<br>ACCGAGUAAACAGAACCAUAAC<br>AUACUAAUACGAAAUUGAAGC<br>(配列番号64) | 59.4 ± 7.6  |
| 33                   | GGGAUUUUGGAAGUAGAGUAGUA<br>GAUAGUUAUGAACAGAGGAGACA<br>UAACAUGCUAUCUACAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号65)    | GGGCAGAGCGGUCUGUUUCGAC<br>CGCUCUGAAACAUAACUAUCUA<br>CUACUCUACUCCAAAUUCUA<br>(配列番号66)  | 58.5 ± 9.6  |
| 34                   | GGGAGUAAUGAUGAUUAAGUUUG<br>AAUGUAGUGAAACAGAGGAGAU<br>ACUAAUGUCAACUAUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号67)     | GGGACCGUACCCUACAUCGGG<br>UGACGGUAAAUACAUACAUA<br>AACUAUAUCAUAUUAUACUAAC<br>(配列番号68)   | 57.1 ± 5.0  |
| 35                   | GGGAUAAUGGAGAUUGGAGUAGGG<br>UAUGAUUGUAGACAGAGGAGAU<br>CAAUAUGACCCUACUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号69)    | GGGCCUAGAAACUGUACGAAGU<br>UUCUAGGCAUUAUACAUAUACC<br>CUACUCCAUUCCAUUAUUCU<br>(配列番号70)  | 53.9 ± 4.5  |
| 36                   | GGGAUGAAUAUGGACAGUUGAGU<br>AGUGAUGUGAAACAGAGGAGAU<br>ACAUUAUGUACUACAUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号71)    | GGGAGUCAGGACCGCAUCAGGU<br>CCUGACUAAAUACAUAUACUAC<br>UCAACUGUCCAUAUUAUUCU<br>(配列番号72)  | 53.4 ± 6.7  |
| 37                   | GGGAUGGAGAUUGAUUAUGAUUG<br>GAUGUGCUUAAACAGAGGAGAU<br>AGCAAUGCCAAUCAUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号73)     | GGGUCGACCGCUCCUGCUCGAG<br>CGGUCGACAAUAGCACAUA<br>AUCAUAAUCAUUCUCCAUAAC<br>(配列番号74)    | 52.7 ± 1.8  |
| 38                   | GGGAGUAAAGAUUGUGAUAAAGU<br>AAUGUGCGUGAACAGAGGAGACA<br>CGCAAUGUACUUUAUAACCUGG<br>CGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号75)    | GGGUCACGGAGCGGAUUUGCGC<br>UCCGUGAGAACACGCACAUA<br>UUUAUCACAAUUCUUAUUA<br>(配列番号76)     | 51.0 ± 4.5  |

10

20

30

40

【表 5】

表3. フォワードエンジニアリング型トーホールドスイッチのセットについての配列および性能情報。

| トーホールド<br>スイッチ<br>番号 | スイッチ配列                                                                                                                        | トリガー配列                                                                                  | オン/オフ     |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1                    | GGGUCUUUAUCUUUAUCUUCGUUU<br>AUCCUGCAUACAGAAACAGAGGAG<br>AUAUGCAAUGAUAAACGAGAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号77)    | GGGACUGACUAUUCUGUGCAAU<br>AGUCAGUAAAGCAGGGAUAAAC<br>GAGAUAGAUAAAGAUAGAUAG<br>(配列番号78)   | 665 ± 135 |
| 2                    | GGGAGUUUGAUUACAUAUGUCGUUA<br>GUUAGUGAUACAUAACAGAGGAG<br>AUAUCACAUGACUAAACGAAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号79)    | GGGACAGAUCCACUGAGGCGUG<br>GAUCUGUGAACACUAAACUAAA<br>CGACAAUGUAAUCAAAACUAAAC<br>(配列番号80) | 586 ± 92  |
| 3                    | GGGAUCUAUUACUACUUAACAUUGU<br>CUUGCUCUAUACAGAAACAGAGGAG<br>AUAUAGAAUGAGACAAUGGAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号81)  | GGGUGAUGGGACAUCCGAUGU<br>CCCAUCAAAUAGAGCAAGACAA<br>UGGUAAGUAGUAAUAGAUAAAG<br>(配列番号82)   | 557 ± 68  |
| 4                    | GGGCGAUUAUGGAUUAAGAGCUCCGU<br>UUACUGUCAUACAAGAACAGAGGAG<br>AUAUGACAUGAAACGGAGCAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号83) | GGGACGAAUUCACCCUAAUGUG<br>AAUUCGUAAAGACAGUAAACGG<br>AGCUCUAAUCCAUAUUCGAAC<br>(配列番号84)   | 483 ± 40  |
| 5                    | GGGUAUGUAAUUGAUUUGGCUUCUG<br>UUAGUUUCUAACAAGAACAGAGGAG<br>AUAUGAAUAGAACAGAAGCAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号85)  | GGGUCCAUUCUAGGUGAUACUA<br>GAAUGGAGCAGAAACUAAACAGA<br>AGCCAAAUCAAUUAACAUACUA<br>(配列番号86) | 453 ± 119 |
| 6                    | GGGCUUUAUCUUACCUUCGCUUGUU<br>CUGUUCGGAUACAGAAACAGAGGAG<br>AUAUCGGAUGAGAAACAAGCAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号87) | GGGACAAUCGGGACGACACUCC<br>CGAUUGUGAACGGAACAGAACA<br>AGCGAAGGUAAAGUUAAGGUA<br>(配列番号88)   | 409 ± 62  |
| 7                    | GGGUCACUUAUACAUAUUGUCGUCGU<br>UUCUAUCUAUACAAGAACAGAGGAG<br>AUAUAGAAUGAAACGACGAAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号89) | GGGUCGAGUAGACAGAGCUGUC<br>UACUCGAAUAAGAUAGAAACGA<br>CGACAAUAGAUUAAGUGAGAA<br>(配列番号90)   | 403 ± 99  |
| 8                    | GGGACCUCUACUUCUCUCACUCUU<br>ACUUCUGCAUAGUAGAACAGAGGAG<br>AUAUGCAAUGGUAAAGAGUGAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号91)  | GGGACUGAGCUGCUAUCACGCA<br>GCUCAGUAGAGCAGAAGUAAGA<br>GUGAGAGUAAGUAGAGGUAGA<br>(配列番号92)   | 393 ± 41  |
| 9                    | GGGCUUACUACUUGACACCUGAUU<br>CUGACACGAUAACAGAAACAGAGGAG<br>AUAUCGUAUGAGAAUCAGGAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号93)  | GGGUCAAUUAACCGUGGUAGGG<br>UAAUUGAAAGCGUGUCAGAAUC<br>AGGUGUCAAGUAGUAAGUAG<br>(配列番号94)    | 381 ± 32  |
| 10                   | GGGAAUGGAAUGAAUGAACUGCUUG<br>UCUUAUGUAUACAGAAACAGAGGAG<br>AUAUACAAUGGACAAGCAGAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号95)  | GGGCGAAGUGUCCGUAGAGGA<br>CACUUCGACGACAUAAAGACAAG<br>CAGUUCAUUCAUUCUUAUUAAG<br>(配列番号96)  | 343 ± 64  |
| 11                   | GGGCGAAUAGAAUAGAAAGCUAGUG<br>UCGUUGUCAUACAGAAACAGAGGAG<br>AUAUGACAUGGACACUAGCAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAAGUAGCGUAAA<br>(配列番号97)  | GGGACUCCACGCCGACCGUGGC<br>GUGGAGUAAAGACAACGACACU<br>AGCCUUCAUUUCUAUUCGAUU<br>(配列番号98)   | 292 ± 40  |

【表 6】

| トーホールド<br>スイッチ<br>番号 | スイッチ配列                                                                                                                       | トリガー配列                                                                                  | オン/オフ    |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 12                   | GGGCAAUUUCGUAUAUGUUCGUCUU<br>UGCUGUUCUAUACAAGAACAGAGGAG<br>AUAUGAAAUGCAAAGACGAAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号99) | GGGCGACGAUGCCAGGUAUGGC<br>AUCGUCGGACGAACAGCAAAGA<br>CGAACAUUAUACGAAAUUGAAA<br>(配列番号100) | 288 ± 19 |
| 13                   | GGGAUGGAAUUGAGAUGGGCUUUCG<br>CGAGAUUGAUACAGAAACAGAGGAG<br>AUAUCAAUUGCGCGAAAGCAACCUG<br>GCGGCAGCGCAAAAGAUGCGUAAA<br>(配列番号101) | GGGUGCGGUAGUAGGUUCCUAC<br>UACCGCAAUACAAUCUCGCGAA<br>AGCCCCAUCUCAAUUCCAUACU<br>(配列番号102) | 33 ± 3   |

10

## 【0174】

均等物

いくつかの本発明の実施形態を本明細書に記載および説明したが、当業者はその機能を実施し、および／または本明細書に記載の結果および／または1つ以上の利点を得るための種々の他の手段および／または構造の構想を容易に想定し、そのような変形または改変のそれぞれが、本明細書に記載の本発明の実施形態の範囲内であると考えられる。より一般的には、当業者は、本明細書に記載の全てのパラメータ、寸法、材料、および構成が例示的であることを意味し、実際のパラメータ、寸法、材料、および／または構成が本発明の教示が使用される1つまたは複数の特定の出願に依存することを容易に認識する。当業者は、定型実験を超えないものを使用して、本明細書に記載の特定の発明の実施形態に対する多くの均等物を認識し、または確認することができる。したがって、上記の実施形態が例示によってのみ提示され、添付の特許請求の範囲およびその均等物の範囲内で、本発明の実施形態は、具体的に記載され、特許請求された以外に実施することができることを理解されたい。本開示の本発明の実施形態は、本明細書に記載のそれぞれの個々の特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法に指向される。さらに、2つ以上のこのような特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法の任意の組合せも、このような特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法が相互に不一致でない場合、本開示の本発明の範囲内に含まれる。

20

30

## 【0175】

本明細書において定義および使用される全ての定義は、辞書の定義、参照文献により取り込まれる文書中の定義および／または定義される用語の通常の意味に関して優先すると理解すべきである。

## 【0176】

本明細書に開示の全ての参照文献、特許および特許出願は、それぞれが引用され、一部の場合において、文書の全体を包含し得る主題に関して参照により取り込まれる。

## 【0177】

本明細書および特許請求の範囲において使用される不定冠詞「a」および「an」は、反対に明白に示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解されるべきである。

40

## 【0178】

本明細書および特許請求の範囲において使用される語句「および／または」は、そのように等位接続される要素の「いずれかまたは両方」、すなわち、ある場合には接続して存在し、他の場合には分離して存在する要素を意味すると理解されるべきである。「および／または」により列記される複数の要素は、同一様式、すなわち、そのように等位接続される要素の「1つ以上」で解釈されるべきである。他の要素は、場合により、「および／または」節により具体的に同定される要素以外で、具体的に同定されるそれらの要素に関係してまたは無関係に存在し得る。したがって、非限定的な例として、「Aおよび／また

50

はB」への参照は、オープンエンド型の語、例えば、「含む」とともに用いた場合、一実施形態において、Aのみ（場合により、B以外の要素を含む）；別の実施形態において、Bのみ（場合により、A以外の要素を含む）；さらに別の実施形態において、AおよびBの両方（場合により、他の要素を含む）などを指し得る。

【0179】

本明細書および特許請求の範囲において使用される「または」は、上記定義の「および／または」と同一の意味を有すると理解されるべきである。例えば、列記中の項目を分離する場合、「または」または「および／または」は包括的、すなわち、多数の要素または要素の列記の少なくとも1つ（しかし、2つ以上も含む）および場合により、列記されていない追加の項目の包含であると解釈されるものとする。反対に明白に示された用語のみ、例えば、「～の1つのみ」または「～の正確に1つ」、または特許請求の範囲において使用される場合、「～からなる」が、多数の要素または要素リストの列記の正確に1つの要素の包含を指す。一般に、本明細書において使用される用語「または」は、排除性の用語、例えば、「いずれか」、「～の1つ」、「～の1つのみ」、または「～の正確に1つ」により先行された場合に単に排他的な選択肢（すなわち、「一方または他方であるが両方でない」）のみを示すと解釈されるものとする。特許請求の範囲において使用される場合の「本質的に～からなる」は、特許法の分野において使用されるその通常の意味を有するものとする。

10

【0180】

本明細書および特許請求の範囲において使用される1つ以上の要素の列記に関する語句「少なくとも1つ」は、要素の列記における要素のいずれか1つ以上から選択される少なくとも1つの要素を意味するが、必ずしも、要素の列記内で具体的に列記されるそれぞれおよび全ての要素の少なくとも1つを含むとは限らず、要素の列記における要素の任意の組合せを排除しないと理解されるべきである。この定義は、具体的に同定されるそれらの要素に関連してまたは無関係に、語句「少なくとも1つ」が指す要素の列記内で具体的に同定される要素以外の要素が場合により存在し得ることも可能とする。したがって、非限定的な例として、「AおよびBの少なくとも1つ」（または、同義で「AまたはBの少なくとも1つ」、または同義で「Aおよび／またはBの少なくとも1つ」）は、一実施形態において、場合により、Bが存在しない（および場合により、B以外の要素を含む）2つ以上を含む少なくとも1つのA；別の実施形態において、場合により、Aが存在しない（および場合により、A以外の要素を含む）2つ以上を含む少なくとも1つのB；さらに別の実施形態において、場合により2つ以上を含む少なくとも1つのAおよび場合により2つ以上を含む少なくとも1つのB（場合により、他の要素を含む）などを指し得る。

20

30

【0181】

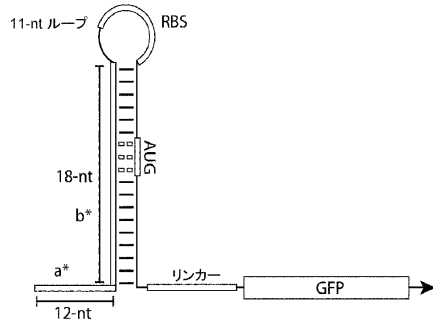
反対に明白に示されない限り、2つ以上のステップまたは動作を含む本明細書において特許請求されるいずれかの方法において、方法のステップまたは動作の順序は、必ずしも、方法のステップまたは動作が示される順序に限定されるものではないことも理解されるべきである。

【0182】

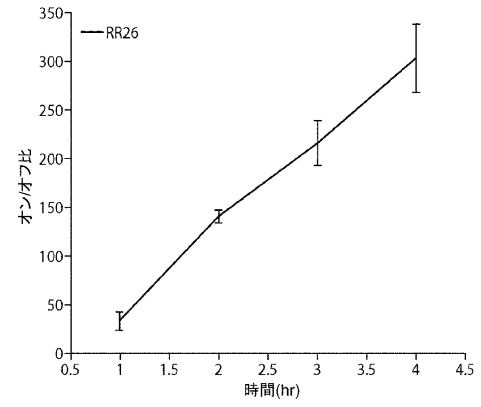
特許請求の範囲および上記の本明細書において、全ての移行句は、例えば、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「保有する」、「有する」、「含有する」、「含む (involving)」、「保持する」、「～から構成される」などは、オープンエンド、すなわち、限定されるものではないが、含むを意味すると理解されたい。移行句「～からなる」および「本質的に～からなる」のみ、それぞれ、米国特許庁特許審査便覧、第2111.03項に記載のクローズドまたはセミクローズドの移行句であるものとする。

40

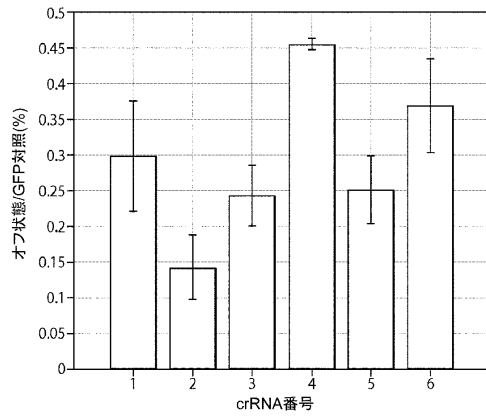
【図 1】



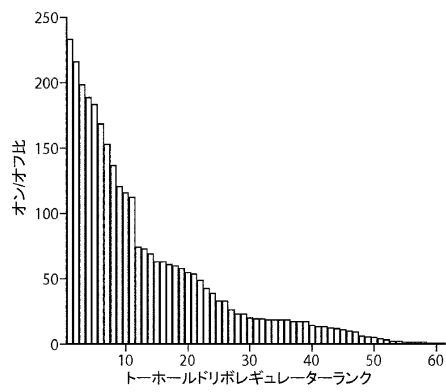
【図 3】



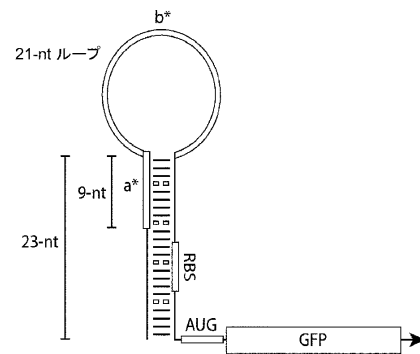
【図 2】



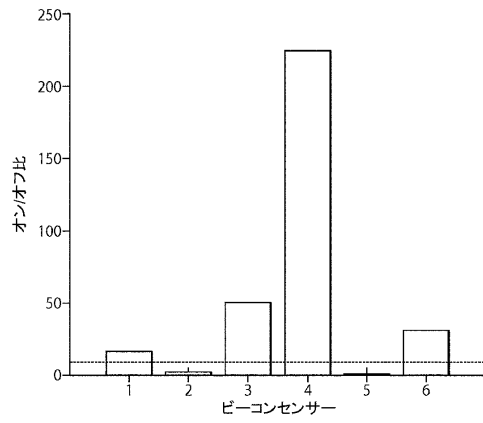
【図 4】



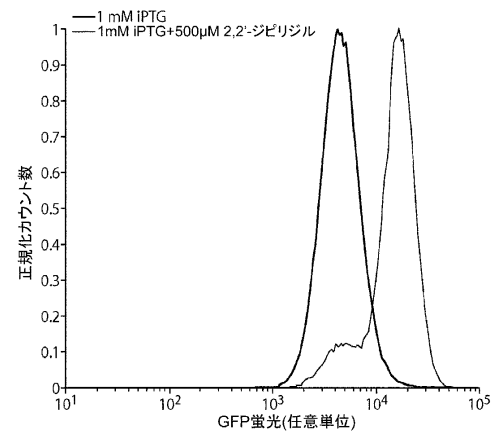
【図 5】



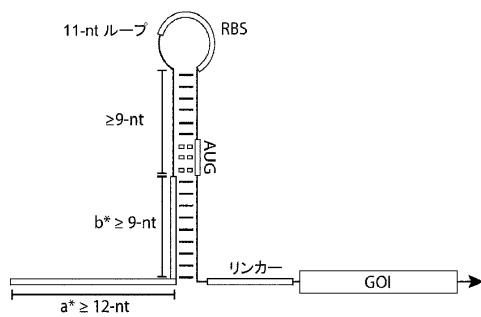
【図 6】



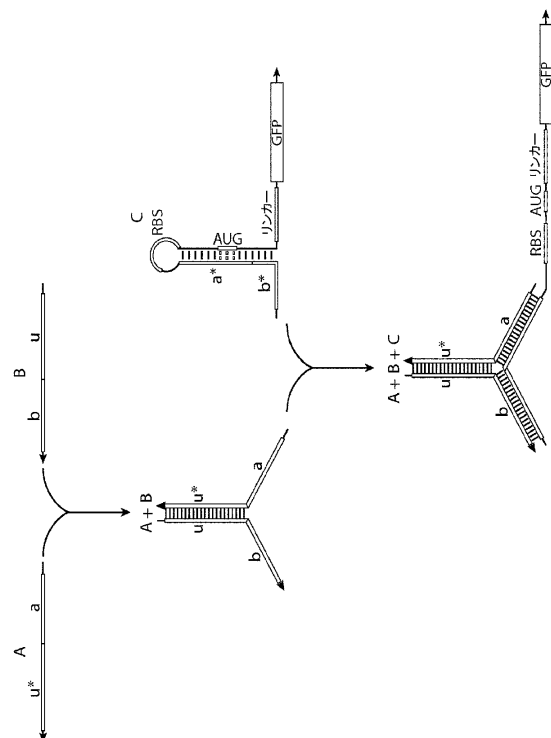
【図 7】



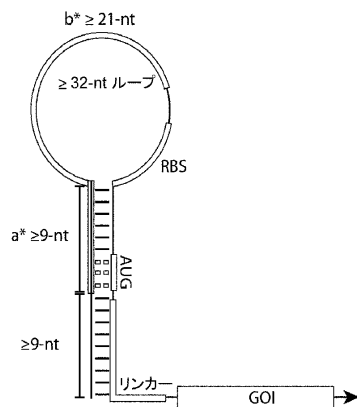
【図 8 A】



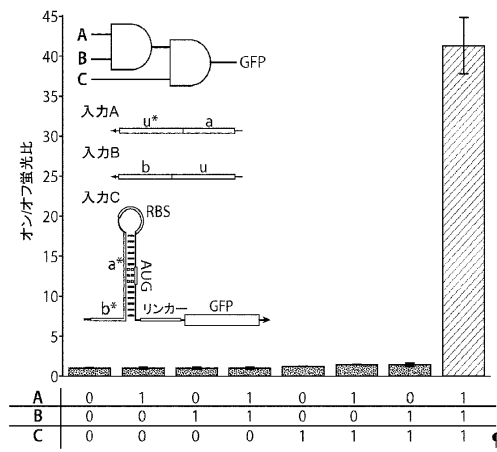
【図 9 A】



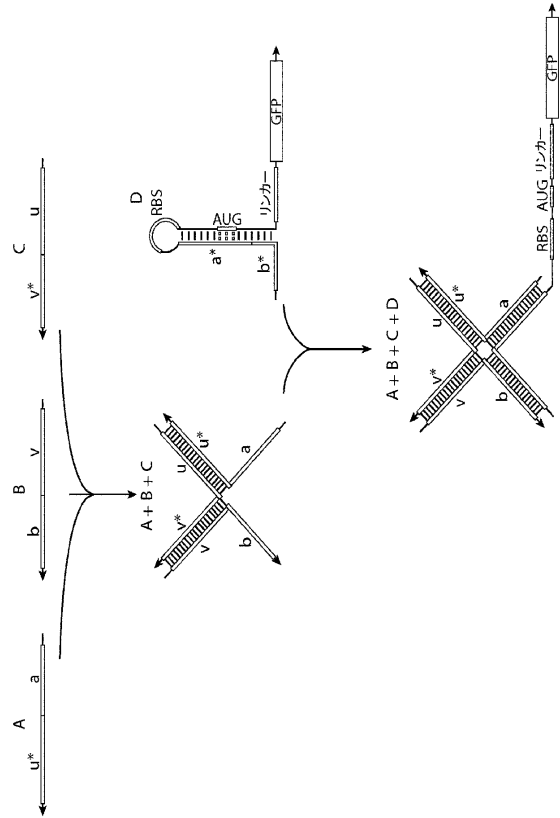
【図 8 B】



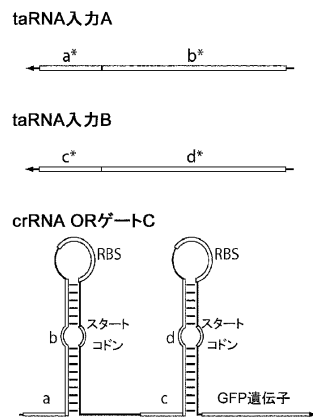
【図 9 B】



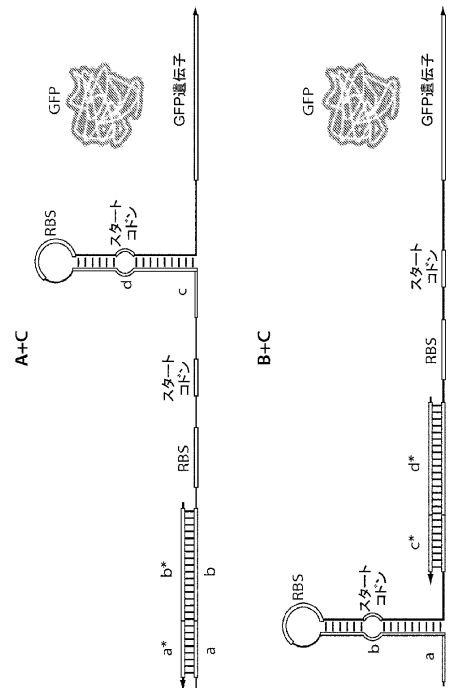
【図 10】



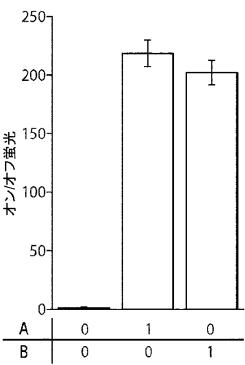
【図 11 A】



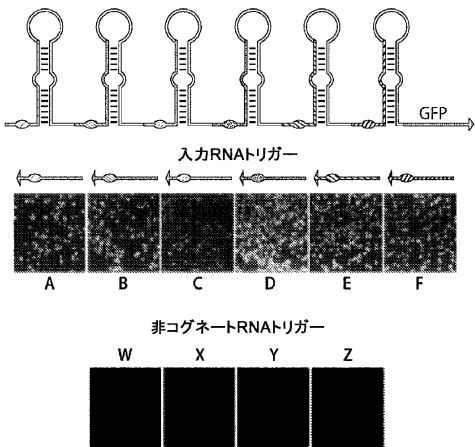
【図 11 B】



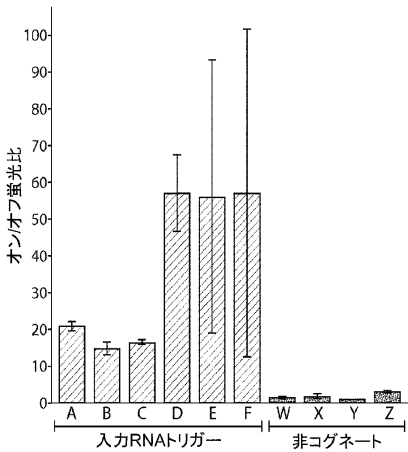
【図 1 1 C】



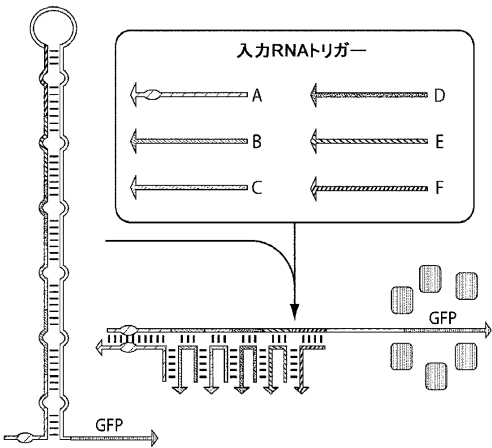
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】

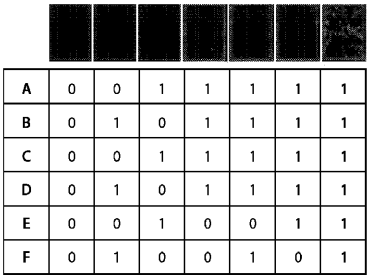
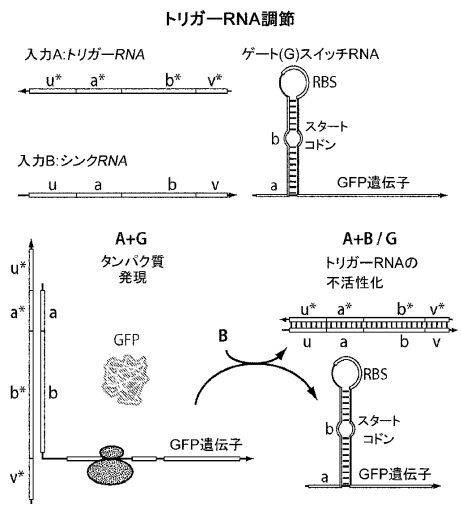
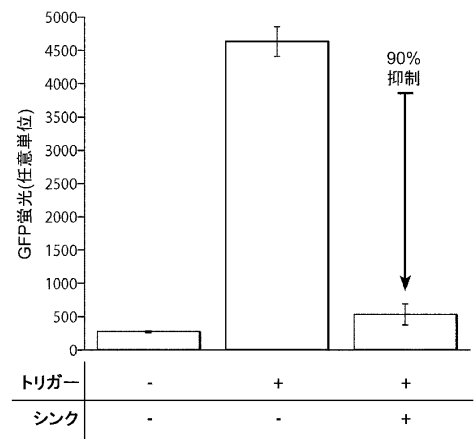


Fig. 13B

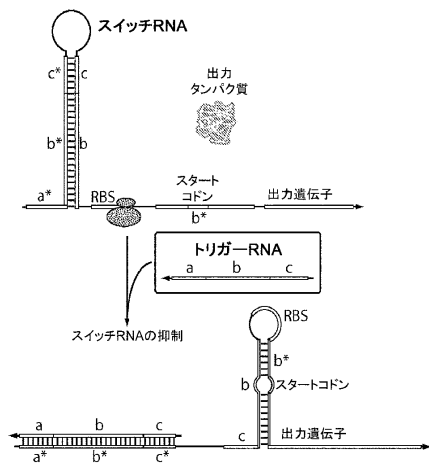
【図 1 4 A】



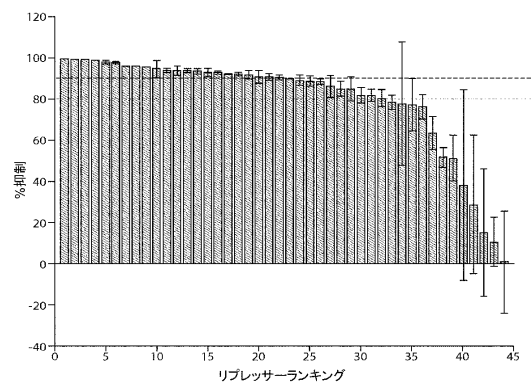
【図 1 4 B】



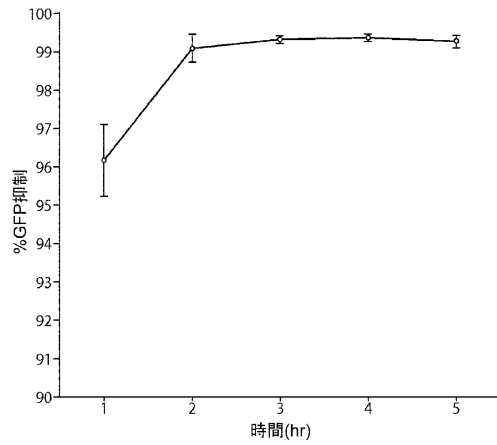
【図 1 5 A】



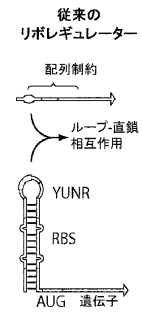
【図 1 5 B】



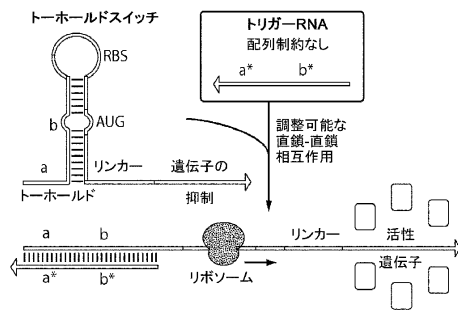
【図 16】



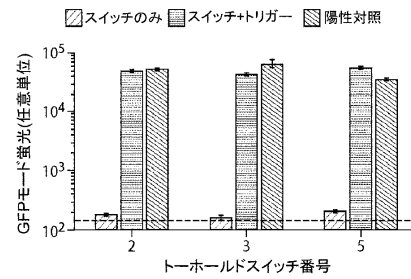
【図 17 A】



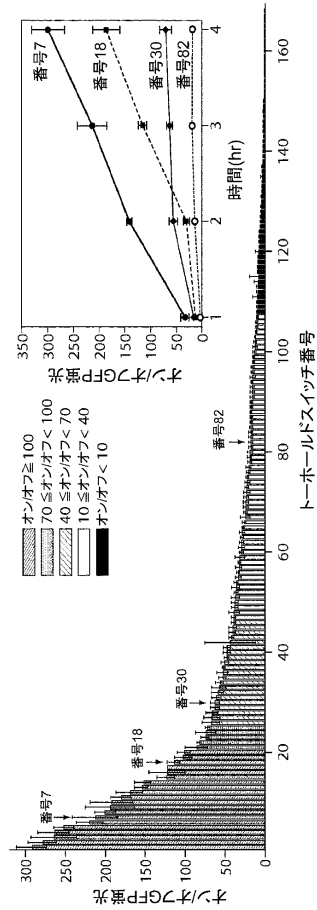
【図 17 B】



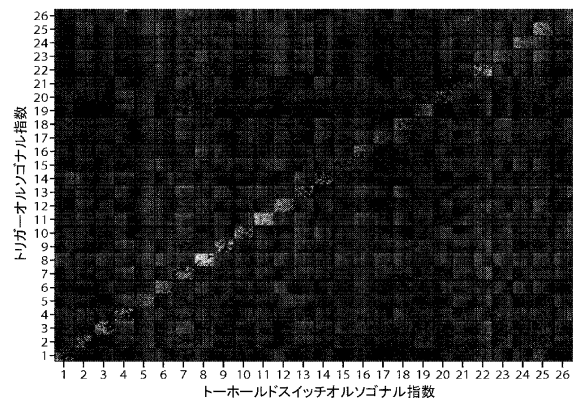
【図 17 C】



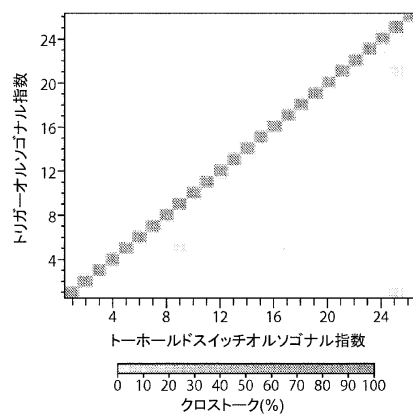
【図 17 D】



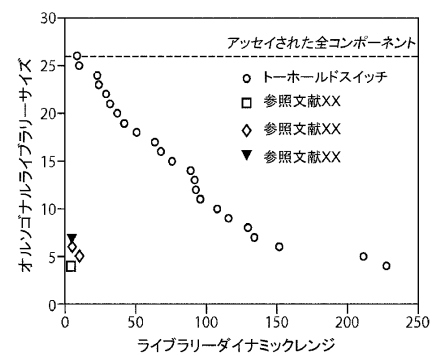
【図 18 A】



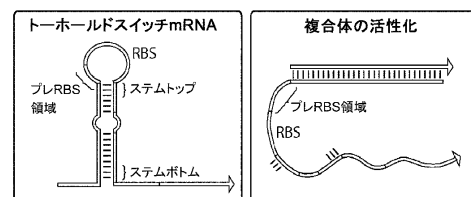
【図 18 B】



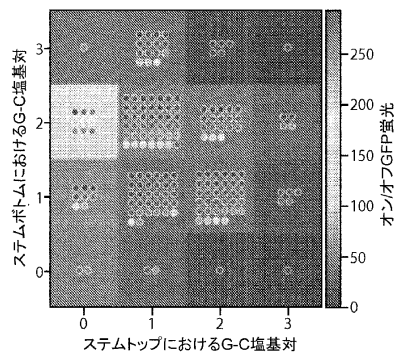
【図 18 C】



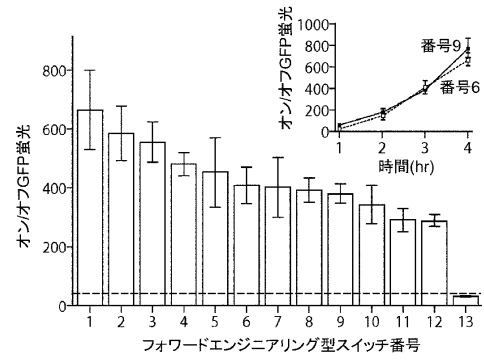
【図 19 A】



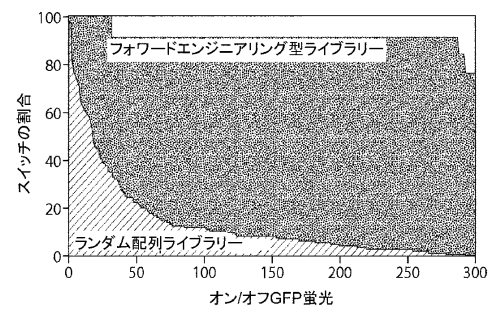
【図 19 B】



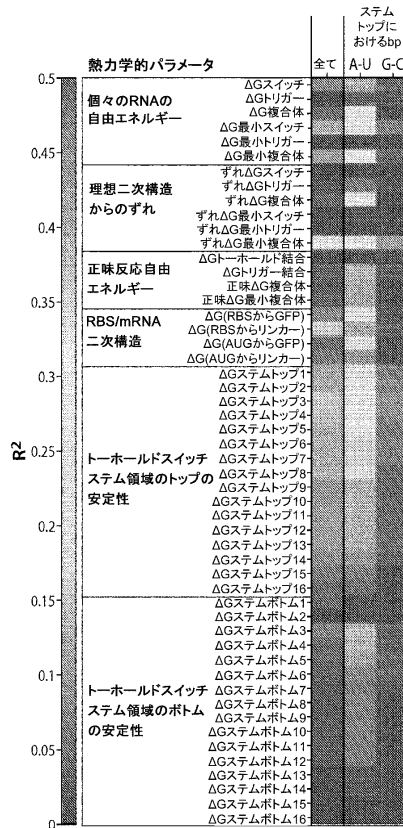
【図 19 C】



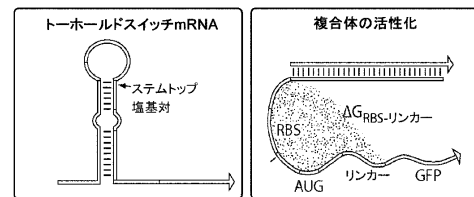
【図 19 D】



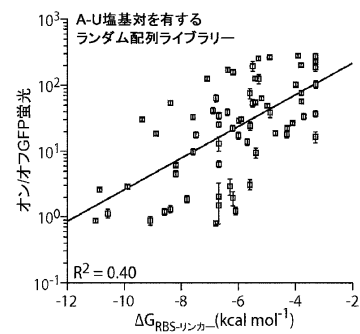
【図 20 A】



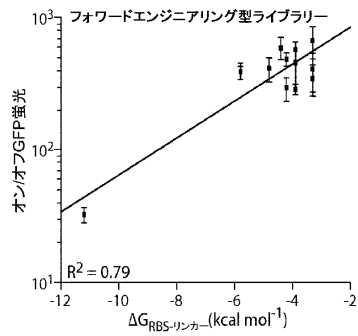
【図 20 B】



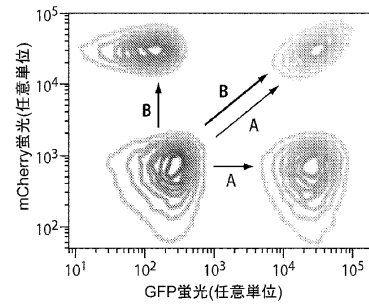
【図 20 C】



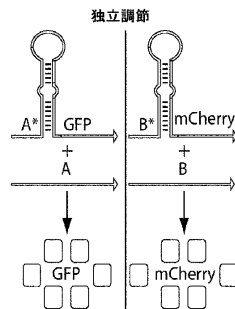
【図 2 0 D】



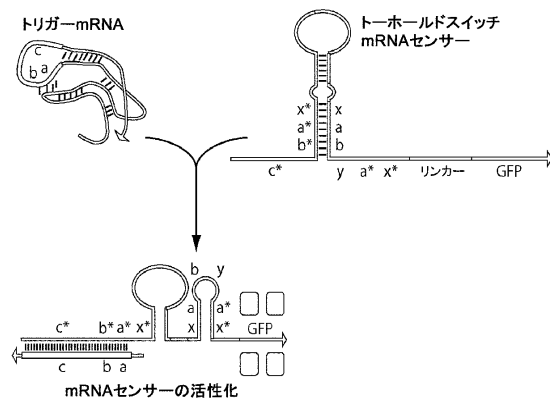
【図 2 1 B】



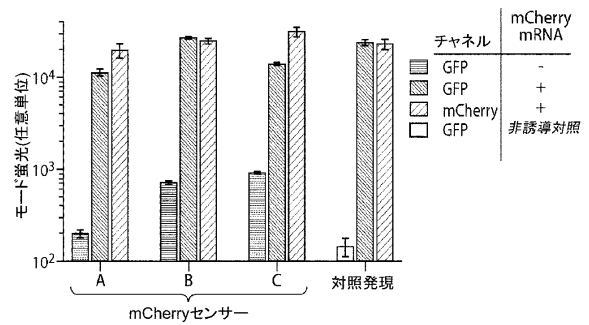
【図 2 1 A】



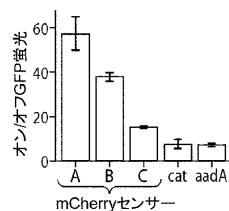
【図 2 1 C】



【図 2 1 E】



【図 2 1 D】



【配列表】

0006130923000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
- |         |       |           |         |       |   |
|---------|-------|-----------|---------|-------|---|
| C 1 2 Q | 1/68  | (2006.01) | C 1 2 Q | 1/68  | A |
| C 1 2 Q | 1/02  | (2006.01) | C 1 2 Q | 1/02  |   |
| C 1 2 P | 21/02 | (2006.01) | C 1 2 P | 21/02 | C |
- (74)代理人 100109346  
弁理士 大貫 敏史
- (74)代理人 100117189  
弁理士 江口 昭彦
- (74)代理人 100134120  
弁理士 内藤 和彦
- (72)発明者 グリーン, アレクサンダー, エー.  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 1 5, ボストン, マサチューセッツ アベニュー 1 9 9
- (72)発明者 イン, ペン  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 4 5, ブルックライン, ポンド アベニュー 9 9, ナンバー 9 0 1
- (72)発明者 コリンズ, ジェームズ, ジェイ.  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 2 1 5, ボストン, カミントン ストリート 4 4

審査官 西 賢二

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 0 6 6 7 5 8 (WO, A 1)  
国際公開第 2 0 0 6 / 0 8 8 1 6 5 (WO, A 1)  
国際公開第 2 0 0 4 / 0 4 6 3 2 1 (WO, A 2)  
米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 7 2 2 1 5 (US, A 1)  
RODRIGO, G. et al., "De novo automated design of small RNA circuits for engineering synthetic riboregulation in living cells", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2 0 1 2 年 9 月 1 8 日, Vol. 109, pp. 15271-15276  
CALLURA, J. M. et al., "Genetic switchboard for synthetic biology applications", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2 0 1 2 年 4 月 1 0 日, Vol. 109, pp. 5850-5855  
LUCKS, J. B. et al., "Versatile RNA-sensing transcriptional regulators for engineering genetic networks", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2 0 1 1 年, Vol. 108, pp. 8617-8622  
MUTALIK, V. K. et al., "Rationally designed families of orthogonal RNA regulators of translation", Nat. Chem. Biol., 2 0 1 2 年 5 月, Vol. 8, pp. 447-454  
ISAACS, F. J. et al., "Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression", Nat. Biotechnol., 2 0 0 4 年, Vol. 22, pp. 841-847

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- |                             |                       |
|-----------------------------|-----------------------|
| C 1 2 N                     | 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0 |
| C 1 2 Q                     | 1 / 0 0 - 3 / 0 0     |
| MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) |                       |