(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2016-505959

(P2016-505959A)

(43)公表日　平成28年2月25日(2016.2.25)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G06F 19/20	(2011.01)	G06F	19/20	ZNA	4B024
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B050
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	101	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 119 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-547996 (P2015-547996)
(86)(22)出願日　平成25年12月13日 (2013.12.13)
(85)翻訳文提出日　平成27年8月14日 (2015.8.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/075068
(87)国際公開番号　WO2014/093852
(87)国際公開日　平成26年6月19日 (2014.6.19)
(31)優先権主張番号　61/736,792
(32)優先日　平成24年12月13日 (2012.12.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/757,113
(32)優先日　平成25年1月26日 (2013.1.26)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　596060697
マサチューセッツ　インスティテュート　オブ　テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７
(74)代理人　100102842
弁理士　葛和　清司
(72)発明者　ルー，ティモシー，クアン－タ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１２９、チャールスタウン、ハーバード　プレイス　１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】リコンビナーゼに基づく論理／メモリシステム

(57)【要約】
本発明は、特に、生細胞における統合論理／メモリを提供する、リコンビナーゼに基づくシステムを提供する。

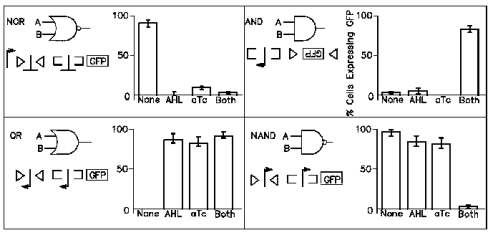


FIG. 2-1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
単一細胞内で作動可能な合成論理／メモリシステムであって、システムが、以下：
少なくとも２つの誘導性プロモーターおよび少なくとも２つのリコンビナーゼをコードする複数の核酸配列、ここでリコンビナーゼをコードする複数の核酸配列の各々は、異なる誘導性プロモーターに作動可能に連結されている、
（１）プロモーターおよび／または（２）一方向性ターミネーターに作動可能に連結されているかまたは条件付きで作動可能に連結されている出力核酸配列の単一遺伝子回路構築物である、複数の論理ゲート、ここで出力核酸、プロモーターおよび一方向性ターミネーターの少なくとも１つは、リコンビナーゼの少なくとも１つのフォワード認識部位およびリバース認識部位に隣接している、
を含み、
ここで前記論理ゲートが、ＴＲＵＥ論理ゲートおよびＦＡＬＳＥ論理ゲートを除く全ての２入力ブール論理関数を提供する、前記合成論理／メモリシステム。
【請求項２】
少なくとも２つのリコンビナーゼが、不可逆的リコンビナーゼである、請求項１に記載の合成論理／メモリシステム。
【請求項３】
少なくとも２つの不可逆的リコンビナーゼが、セリンリコンビナーゼである、請求項２に記載の合成論理／メモリシステム。
【請求項４】
セリンリコンビナーゼが、Bxb1およびphiC31である、請求項３に記載の合成論理／メモリシステム。
【請求項５】
論理ゲートが、ＮＯＲ、ＡＮＤ、ＯＲ、ＮＡＮＤ、Ａ、ＮＯＴ Ａ、Ｂ、ＮＯＴ Ｂ、Ａ ＩＭＰＬＹ Ｂ、Ａ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ、Ｂ ＩＭＰＬＹ Ａ、Ｂ ＮＩＭＰＬＹ Ａ、ＸＯＲおよびＸＮＯＲである、請求項１～４のいずれか一項に記載の合成論理システム。
【請求項６】
ＴＲＵＥおよび／またはＦＡＬＳＥ論理ゲートをさらに含み、
ここでＴＲＵＥ論理ゲートが、プロモーターに作動可能に連結された出力核酸配列の単一遺伝子回路構築物であり、および
ここでＦＡＬＳＥゲートが、反転プロモーターのすぐ下流の出力核酸配列の単一遺伝子回路構築物である、
請求項１に記載の合成論理／メモリシステム。
【請求項７】
出力核酸が出力産物をコードする、請求項１～６のいずれか一項に記載の合成論理／メモリシステム。
【請求項８】
出力産物が、レポータータンパク質、転写リプレッサー、転写アクチベーター、選択マーカー、酵素、受容体タンパク質、リガンドタンパク質、ＲＮＡ、リボスイッチ、ショートヘアピンＲＮＡまたはリコンビナーゼである、請求項７に記載の合成論理／メモリシステム。
【請求項９】
ＮＯＲ論理ゲートが、（ａ）プロモーターに作動可能に連結された出力核酸、および（ｂ）２つの一方向性ターミネーターの、単一遺伝子回路構築物であり、ここで各ターミネーターは反転されており、異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、かつプロモーターと出力核酸との間に配置されている、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。
【請求項１０】
ＡＮＤ論理ゲートが、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一

遺伝子回路構築物であり、ここで出力核酸およびプロモーターはそれぞれ反転されており、かつ異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項１１】

ＯＲ論理ゲートが、２つのプロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで各プロモーターは反転されており、かつ異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項１２】

ＮＡＮＤ論理ゲートが、２つのプロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで各プロモーターは異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項１３】

Ａ論理ゲートが、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで出力核酸は反転されており、かつフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項１４】

Ｂ論理ゲートが、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターは反転されており、かつフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項１５】

ＮＯＴ Ａ論理ゲートが、プロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで出力核酸はフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項Ａ４に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項１６】

ＮＯＴ Ｂ論理ゲートが、プロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターはフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項１７】

Ａ ＩＭＰＬＹ Ｂ論理ゲートが、第１プロモーターに作動可能に連結され、および第２プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで第１プロモーターはフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、第２プロモーターは反転されており、異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、かつ第１プロモーターと出力核酸との間に配置されている、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項１８】

Ｂ ＩＭＰＬＹ Ａ論理ゲートが、第１プロモーターに条件付きで作動可能に連結され、および第２プロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで第１プロモーターは反転されており、かつフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、第２プロモーターは異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、かつ第１プロモーターと出力核酸との間に配置されている、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項１９】

Ａ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ論理ゲートが、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターはフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、および出力核酸は反転されており、かつ異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項２０】

ＢＮＩＭＰＬＹＡ論理ゲートが、プロモーターおよび一方向性ターミネーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターは反転されており、かつフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、およびターミネーターは反転されており、異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、かつプロモーターと出力核酸との間に配置されている、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項２１】

ＸＯＲ論理ゲートが、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターは反転されており、かつ２つのフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項５Ａ４に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項２２】

ＸＮＯＲ論理ゲートが、プロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで出力核酸は２つのフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している、請求項５に記載の合成論理／メモリシステム。

【請求項２３】

請求項１～２２のいずれか一項に記載の合成論理／メモリシステムを含む、細胞。

【請求項２４】

少なくとも１つの不可逆的リコンビナーゼ、および請求項１～２２のいずれか一項に記載の少なくとも２つの論理ゲートを含む、細胞。

【請求項２５】

細胞を操作して、少なくとも１つのリコンビナーゼおよび請求項１～２２のいずれか一項に記載の少なくとも２つの論理ゲートを含むようにすることを含む、遺伝子発現または細胞分化を改変する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本出願は、３５Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１１９（ｅ）の下で、２０１２年１２月１３日に出願された米国仮出願第61/736,792号、および２０１３年１月２６日に出願された米国仮出願第61/757,113号の利益を主張する；これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０００２】

連邦支援研究

本発明は、政府の支援により、National Institutes of Healthによる助成金番号OD008435、およびSpace and Naval Warfare Systems Centerによる契約番号N66001-12-C-4016のもとでなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【０００３】

発明の背景

合成生物学の中心的目標は、意思決定のための入力信号と動作を統合する細胞ネットワークを作り出すことである［１］。近年、人工的な論理ゲート［２～４］とメモリデバイス［５，６］が、独立して構築されてきた。細胞論理の以前の実装においては、複雑なゲートは複数の遺伝子回路の階層化を必要とし［２，７］、したがって回路構成とチューニングに多大な努力が必要であった。これらの複雑な論理ゲートは、組合せ論理のみを実現することができる。

【発明の概要】

【０００４】

本発明は、とりわけ、生細胞において組合せ論理とメモリとを統合するための、合成リコンビナーゼに基づくシステムを提供する。統合された論理およびメモリは、順序論理な

どの、複雑かつ持続的な状態に依存した計算を実行するために重要である［８］。プログラミングルールの定義されたセットを使用して、本発明の論理／メモリシステム（logic and memory system）は、任意のブール論理関数と、事象の、ＤＮＡに基づく安定したメモリとの、効率的なワンステップのアセンブリを可能にする。これらのシステムは、化学誘導物質の入力を利用して、プロモーターからの直交リコンビナーゼの発現を駆動する。これらのリコンビナーゼはＤＮＡの反転または切除のための遺伝子エレメントを標的として、条件付きの核酸発現をもたらす。かかる論理／メモリシステムは、治療、診断および基礎科学的用途のための細胞の状態機械（ステートマシン）、挙動および経路のプログラミングを含む、種々の用途に有用である。

【０００５】

したがって、本発明のいくつかの側面において、本明細書で提供されるのは、単一細胞内で作動可能な合成論理／メモリシステムであって、システムが、以下：少なくとも２つのプロモーターおよび少なくとも２つのリコンビナーゼをコードする複数の核酸配列、ここでリコンビナーゼをコードする複数の核酸配列の各々は、異なるプロモーターに作動可能に連結されている；プロモーターおよび／または一方向性ターミネーターなどの遺伝子調節エレメントに作動可能に連結されているか、または条件付きで作動可能に連結されている出力核酸配列の単一遺伝子回路構築物である、複数の論理ゲート、ここで出力核酸、プロモーターおよびターミネーターなどの遺伝子調節エレメントの少なくとも１つは、リコンビナーゼの少なくとも１つのフォワード認識部位およびリバース認識部位に隣接している；を含み、ここで前記論理ゲートが、ＴＲＵＥ論理ゲートおよびＦＡＬＳＥ論理ゲートを除く全ての２入力ブール論理関数を提供する、前記合成論理／メモリシステムである。

【０００６】

本発明のいくつかの側面において、本明細書で提供されるのは、単一細胞内で作動可能な合成論理／メモリシステムであって、システムが、以下：少なくとも２つのプロモーターおよび少なくとも２つのリコンビナーゼをコードする複数の核酸配列、ここでリコンビナーゼをコードする複数の核酸配列の各々は、異なるプロモーターに作動可能に連結されている；プロモーターおよび／または一方向性ターミネーターなどの遺伝子調節エレメントに作動可能に連結されているか、または条件付きで作動可能に連結されている出力核酸配列の単一遺伝子回路構築物である、複数の論理ゲート、ここで出力核酸、プロモーターおよびターミネーターなどの遺伝子調節エレメントの少なくとも１つは、リコンビナーゼの少なくとも１つのフォワード認識部位およびリバース認識部位に隣接している；を含み、ここで前記論理ゲートが、少なくとも２種の２入力ブール論理関数を提供する、前記合成論理／メモリシステムである。いくつかの態様において、論理ゲートは、少なくとも３種、少なくとも４種、少なくとも５種、少なくとも６種、少なくとも７種、少なくとも８種、または少なくとも９種の、２入力ブール論理関数を提供する。いくつかの態様において、論理ゲートは、ＴＲＵＥ論理ゲートおよびＦＡＬＳＥ論理ゲートを提供し、一方別の態様において、論理ゲートは、ＴＲＵＥ論理ゲートおよびＦＡＬＳＥ論理ゲートを提供しない。

【０００７】

リコンビナーゼの発現は、外部入力または細胞調節信号などの目的の信号に、作動可能に連結されている。いくつかの態様において、少なくとも２つのプロモーターの１または２以上は、誘導性プロモーターである。

いくつかの態様において、少なくとも２つのリコンビナーゼは、不可逆的リコンビナーゼである。いくつかの態様において、少なくとも２つの不可逆的リコンビナーゼは、セリンリコンビナーゼである。いくつかの態様において、セリンリコンビナーゼは、Bxb1およびphiC31である。

いくつかの態様において、論理ゲートは、ＮＯＲ、ＡＮＤ、ＯＲ、ＮＡＮＤ、Ａ、ＮＯＴ Ａ、Ｂ、ＮＯＴ Ｂ、Ａ ＩＭＰＬＹ Ｂ、Ａ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ、Ｂ ＩＭＰＬＹ Ａ、Ｂ ＮＩＭＰＬＹ Ａ、ＸＯＲおよびＸＮＯＲである。いくつかの態様において、本発明の合

成論理／メモリシステムはさらに、ＴＲＵＥおよび／またはＦＡＬＳＥ論理ゲートを含み、ここでＴＲＵＥ論理ゲートは、プロモーターに作動可能に連結された出力核酸配列の単一遺伝子回路構築物であり、およびＦＡＬＳＥ論理ゲートは、反転プロモーターのすぐ下流の出力核酸配列の単一遺伝子回路構築物である。

【０００８】

いくつかの態様において、出力核酸は出力産物をコードする。いくつかの態様において、出力産物は、レポータータンパク質、転写リプレッサー、転写アクチベーター、選択マーカー、酵素、受容体タンパク質、リガンドタンパク質、ＲＮＡ、リボスイッチ、ショートヘアピンＲＮＡまたはリコンビナーゼである。

いくつかの態様において、ＮＯＲ論理ゲートは、（ａ）プロモーターに作動可能に連結された出力核酸、および（ｂ）２つの一方向性ターミネーターの単一遺伝子回路構築物であり、ここで各ターミネーターは反転されており、異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、かつプロモーターと出力核酸との間に配置されている。

いくつかの態様において、ＡＮＤ論理ゲートは、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで出力核酸とプロモーターはそれぞれ反転されており、かつ異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。

いくつかの態様において、ＯＲ論理ゲートは、２つのプロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで各プロモーターは反転されており、かつ異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。

【０００９】

いくつかの態様において、ＮＡＮＤ論理ゲートは、２つのプロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで各プロモーターは異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。

いくつかの態様において、Ａ論理ゲートは、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで出力核酸は反転されており、かつフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。

いくつかの態様において、Ｂ論理ゲートは、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターは反転されており、かつフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。

いくつかの態様において、ＮＯＴ Ａ論理ゲートは、プロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで出力核酸はフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。

いくつかの態様において、ＮＯＴ Ｂ論理ゲートは、プロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターはフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。

【００１０】

いくつかの態様において、Ａ ＩＭＰＬＹ Ｂ論理ゲートは、第１プロモーターに作動可能に連結され、および第２プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで第１プロモーターはフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、第２プロモーターは反転されており、異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、かつ第１プロモーターと出力核酸との間に配置されている。

いくつかの態様において、Ｂ ＩＭＰＬＹ Ａ論理ゲートは、第１プロモーターに条件付きで作動可能に連結され、および第２プロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで第１プロモーターは反転されており、かつフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、第２プロモーターは異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、かつ第１プロモーターと

出力核酸との間に配置されている。
いくつかの態様において、Ａ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ論理ゲートは、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターはフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、および出力核酸は反転されており、かつ異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。
【００１１】
いくつかの態様において、Ｂ ＮＩＭＰＬＹ Ａ論理ゲートは、プロモーターおよび一方向性ターミネーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターは反転されており、かつフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、およびターミネーターは反転されており、異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接しており、かつプロモーターと出力核酸との間に配置されている。
いくつかの態様において、ＸＯＲ論理ゲートは、プロモーターに条件付きで作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここでプロモーターは反転されており、かつ２つの異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。
いくつかの態様において、ＸＮＯＲ論理ゲートは、プロモーターに作動可能に連結された出力核酸の単一遺伝子回路構築物であり、ここで出力核酸は２つの異なるフォワードおよびリバースリコンビナーゼ認識部位に隣接している。
【００１２】
いくつかの態様において、論理ゲートは、少なくとも２つのプロモーター（例えば、構成的プロモーター）を含む単一遺伝子回路構築物を含んでよく、ここで各プロモーターは異なる強さである。いくつかの態様において、論理ゲートは、一対のプロモーターを含んでよく、ここで任意に、各プロモーターは異なる強さである。かかる一対のプロモーターは、強さが異なる場合、本明細書において一対の変異体プロモーターと呼んでもよい。いくつかの態様において、プロモーター（単数または複数）は、ｐｒｏＤ、ｐｒｏＡ、およびｐｒｏＣから選択される。
別の側面において、本明細書で提供されるのは、本発明の合成論理／メモリシステムを含む細胞である。いくつかの態様において、細胞は、少なくとも２つの本発明の論理ゲートを含む。
さらに別の側面において、本明細書で提供されるのは、細胞を、少なくとも１つの不可逆的リコンビナーゼおよび少なくとも２つの本発明の論理ゲートを含むように操作することを含む、遺伝子発現または細胞分化を改変する方法である。
【図面の簡単な説明】
【００１３】
添付の図面は、縮尺通りに描くことを意図していない。図面において、様々な図に示される同一またはほぼ同一の構成要素の各々は、同様の数字によって表される。明確にするために、必ずしも全ての構成要素が全ての図面でラベル付けされてはいない。
【図１】図１は、本発明による、リコンビナーゼに基づく統合論理／メモリシステムを構築するためのプラットフォームの概要図を示し、該プラットフォームは、所望の計算関数を、単純なギブソン・アセンブリで構成可能な［プロモーター（単数または複数）］－［ターミネーター（単数または複数）］－［出力］デザインへと翻訳するための、簡単なプログラミング言語を含む。Ｎ－アシルホモセリンラクトン（ＡＨＬ）（「入力Ａ」）はBxb1リコンビナーゼの発現を活性化し、一方アンヒドロテトラサイクリン（ａＴｃ）（「入力Ｂ」）は、直交リボ調節（riboregulated）系を通じてphiC31リコンビナーゼの発現を活性化する。ここに示したゲート例は、ＡＮＤ機能を実現する。この論理ゲートの性能は、指示された入力セットへの暴露後にフローサイトメトリーによりアッセイして、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）に対して陽性であった細胞のパーセンテージにより特徴付けた。測定は３回の独立した実験からのものであり、エラーバーは平均値の標準誤差を表す。

【００１４】
【図２】図２は、複数の汎用ゲートをカスケード接続することなくブール論理ゲートの完全なセットを実現する、本発明の論理ゲートの概要図を示す。細胞は、入力なし、ＡＨＬのみ、ａＴｃのみ、またはＡＨＬとａＴｃに同時に、暴露された。各論理ゲートの性能は、フローサイトメトリーによりアッセイして、ＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージにより特徴付けた。測定は３回の独立した実験からのものであり、エラーバーは平均値の標準誤差を表す。
【図３】図３は本発明に従った簡単なプログラミングルールの概要図を示し、これは、リコンビナーゼに基づく遺伝子回路の動作を制御して、個々の遺伝子エレメントの異なる組み合わせによる論理ゲートの複数の例示を可能にするものである。図１および図２のデザインに加えて、（ａ）ＮＯＲ論理ゲート、（ｂ）ＡＮＤ論理ゲートおよび（ｃ）ＸＯＲ論理ゲートのユニークな実装が記載されている。測定は３回の独立した実験からのものであり、エラーバーは平均値の標準誤差を表す。
【００１５】
【図４Ａ】図４Ａは、複数細胞世代にわたるメモリの維持を実証するデータのグラフを示す。ＡＮＤゲートを含む細胞は、０日目の後にオン状態（ＧＦＰ発現について陽性／ＧＦＰ陽性）に誘導され、その後９日間、入力信号なしで継続的に希釈し増殖させた。ＧＦＰ発現を維持する細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーによりアッセイした。測定は３回の独立した実験からのものであり、エラーバーは平均値の標準誤差を表す。
【図４Ｂ】図４Ｂは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）産物の電気泳動ゲルの画像（右）、および付随する論理ゲートの図（左）を示す。ＮＯＲゲートの状態は、細胞死の後にＰＣＲで検出した（プライマーを小さな矢印で示す）。ＰＣＲ産物を、１％アガロースゲル上で電気泳動により分析した。
【図５】図５は、フローサイトメトリーデータのグラフを示す。フローサイトメトリーを使用して、リコンビナーゼに基づく論理／メモリシステムの出力をアッセイした。蛍光閾値を全てのシステムに一様に適用して、ＧＦＰ陽性（オン状態）またはＧＦＰ陰性（オフ状態）にあるとみなされる細胞のパーセンテージを決定した。ＡＮＤゲートの代表的なフローサイトメトリーデータは、任意の入力なし、ＡＨＬのみ、ａＴｃのみ、およびＡＨＬとａＴｃ両方を同時に適用した場合について示す。
【００１６】
【図６】図６は、本発明のＡＮＤ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図７】図７は、本発明のＮＯＲ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図８】図８は、本発明のＡＮＤ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図９】図９は、本発明のＯＲ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１０】図１０は、本発明のＮＡＮＤ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１１】図１１は、本発明のＦＡＬＳＥ理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１２】図１２は、本発明のＴＲＵＥ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１３】図１３は、本発明のＡ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１４】図１４は、本発明のＢ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１５】図１５は、本発明のＮＯＴ Ａ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１６】図１６は、本発明のＮＯＴ Ｂ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１７】図１７は、本発明のＡ ＩＭＰＬＹ Ｂ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１８】図１８は、本発明のＢ ＩＭＰＬＹ Ａ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図１９】図１９は、本発明のＡ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図２０】図２０は、本発明のＢ ＮＩＭＰＬＹ Ａ論理ゲートのプラスミドマップを示す

図である。
【図２１】図２１は、本発明のＸＯＲ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図２２】図２２は、本発明のＸＮＯＲ論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図２３】図２３は、本発明のＮＯＲ　ｖ．２（バージョン２）論理ゲートのプラスミドマップを示す。
【図２４】図２４は、本発明のＡＮＤ　ｖ．２論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図２５】図２５は、本発明のＸＯＲ　ｖ．２論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【００１７】
【図２６Ａ】図２６Ａは、デジタル－アナログ変換器を実現するために使用される、反転プロモーターＣ（ｐｒｏＣ）とプロモーターＡ（ｐｒｏＡ）を含む論理ゲートの図（左）、およびこれに付随するＧＦＰ発現出力のグラフ（右）を示す。細胞は、入力なし、ＡＨＬのみ、ａＴｃのみ、またはＡＨＬとａＴｃに同時に、暴露された。非正規化された平均発現レベルは、各バーの右側に蛍光の任意単位（ａ．ｕ．）で与えられ、正規化された発現レベルは、OUTの下にリストされており、ここで値は最も近い整数に丸められており、１ｘは～２７００ａ．ｕ．に相当する。
【図２６Ｂ】図２６Ｂは、デジタル－アナログ変換器を実現するために使用される、反転プロモーターＤ（ｐｒｏＤ）とプロモーターＡ（ｐｒｏＡ）を含む論理ゲートの図（左）、およびこれに付随するＧＦＰ発現出力のグラフ（右）を示す。細胞は、入力なし、ＡＨＬのみ、ａＴｃのみ、またはＡＨＬとａＴｃに同時に、暴露された。非正規化された平均発現レベルは、各バーの右側に蛍光の任意単位（ａ．ｕ．）で与えられ、正規化された発現レベルは、OUTの下にリストされており、ここで値は最も近い整数に丸められており、１ｘは～２７００ａ．ｕ．に相当する。
【図２６Ｃ】図２６Ｃは、デジタル－アナログ変換器を実現するために使用される、反転プロモーターＤ（ｐｒｏＤ）とプロモーターＣ（ｐｒｏＣ）を含む論理ゲートの図（左）、およびこれに付随するＧＦＰ発現出力のグラフ（右）を示す。細胞は、入力なし、ＡＨＬのみ、ａＴｃのみ、またはＡＨＬとａＴｃに同時に、暴露された。非正規化された平均発現レベルは、各バーの右側に蛍光の任意単位（ａ．ｕ．）で与えられ、正規化された発現レベルは、OUTの下にリストされており、ここで値は最も近い整数に丸められており、１ｘは～２７００ａ．ｕ．に対応する。
【００１８】
【図２７】図２７は、デジタル－アナログ変換器のための制御構築物のＧＦＰ蛍光を示すグラフである。gfpと反転プロモーター（ｐｒｏＤ）を含む大腸菌細胞、およびgfpを含まない大腸菌細胞は、両方の入力の不在下で（ＡＨＬおよびａＴｃ入力が両方とも「０」の場合）、図２６Ａ～２６Ｃにおける０ｘ出力に匹敵するアナログ出力の遺伝子発現レベルを示す。
【図２８】図２８は、変異型プロモーターおよびリコンビナーゼ認識部位の、gfp発現に対する効果を試験するため、フォワードおよびリバース散乱によるゲーティングの後に、フローサイトメトリーによって特徴づけられるＧＦＰ蛍光を示すグラフである。蛍光値の測定は、３回の独立した実験からの幾何平均に基づき、エラーバーは平均値の標準誤差を表す。
【図２９】図２９は、本発明の論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図３０】図３０は、本発明の論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図３１】図３１は、本発明の論理ゲートのプラスミドマップを示す図である。
【図３２】図３２は、リコンビナーゼ認識部位（ＲＲＳ）に対するリコンビナーゼの直交性の特徴を示すスキームの一例の図である。
【００１９】
【図３３】図３３は、リコンビナーゼの切除効率と直交性を試験するためのスキームの一例を示す図である。

【図３４】図３４は、生物学的状態機械のための自動化設計アルゴリズムの概要の一例を示す図である。
【図３５】図３５は、下流合成分化ネットワークを開始するための遺伝的スキームの一例を示す図である。
【図３６】図３６は、入力（Ｉｎｐ）の異なる組み合わせおよび順序で４つの異なる蛍光タンパク質（ＦＰ）を生産する、２対４マルチプレクサ回路の一例を示す図である。
【図３７】図３７は、造血幹細胞（ＨＳＣ）分化経路を模倣するネットワークを示す図である。
【図３８Ａ】図３８Ａは、本発明の「４色システム」の一例を示す図であり、これは、２つの核酸出力：青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）と黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）とを含む論理ゲートを有する遺伝子構築物と、２つの核酸出力：赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）と緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）とを含む論理ゲートを有する別の遺伝子構築物を含み、こうして、２つの細胞入力を４つの細胞出力にマッピングすることを可能とする（一般にｎ個の入力→2^{n}の出力に拡張可能）。
【００２０】
【図３８Ｂ】図３８Ｂは、イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）誘導性ＰＬ（ｌａｃ－Ｏ１）プロモーターの制御下のBxb1リコンビナーゼ、およびアラビノース誘導性ｐＢＡＤプロモーターの制御下のphiC31リコンビナーゼを含む、プラスミドマップを示す図である。
【図３８Ｃ】図３８Ｃは、アラビノースのみへの暴露後、およびアラビノースと続いてＩＰＴＧへの暴露後の、４色システムにおける遺伝子エレメントの向きを示す図であり、これにより、ＢＦＰ発現と続いてＹＦＰ発現がもたらされる。
【図３８Ｄ】図３８Ｄは、ＩＰＴＧのみへの暴露後、およびＩＰＴＧと続いてアラビノースへの暴露後の、４色システムにおける遺伝子エレメントの向きを示す図であり、これにより、ＲＦＰ発現と続いてＧＦＰ発現がもたらされる。
【図３８Ｅ】図３８Ｅは、それぞれ、ＩＰＴＧのみ、ＩＰＴＧと続いてアラビノース、アラビノースのみ、またはアラビノースと続いてＩＰＴＧへの暴露後の、ＲＦＰ、ＧＦＰ、ＢＦＰ、またはＹＦＰを発現する酵母細胞の顕微鏡画像を示す図である；細胞は、４色システムの構築物でトランスフェクトした。
【００２１】
【図３９Ａ】図３９Ａは、リボ調節されたBxb1リコンビナーゼおよびphiC31リコンビナーゼを含む、プラスミドマップを示す図である。
【図３９Ｂ】図３９Ｂは、ａＴｃのみへの曝露後、およびａＴｃと続いてＡＨＬへの曝露後の、４色システムにおける遺伝子エレメントの向きを示す図である。
【図３９Ｃ】図３９Ｃは、ＡＨＬのみへの曝露後、およびＡＨＬと続いてａＴｃへの曝露後の、４色システムにおける遺伝子エレメントの向きを示す図である。
【図４０Ａ】図４０Ａは、５０ｎｇ／ｍｌのａＴｃへの暴露後の、ＢＦＰ発現細胞のパーセンテージを経時的にプロットしたグラフを示す。
【図４０Ｂ】図４０Ｂは、２００ｎｇ／ｍｌのａＴｃへの暴露後の、ＢＦＰ発現細胞のパーセンテージを経時的にプロットしたグラフを示す。
【図４０Ｃ】図４０Ｃは、２５０ｎｇ／ｍｌのａＴｃへの暴露後の、ＢＦＰ発現細胞のパーセンテージを経時的にプロットしたグラフを示す。
【００２２】
【図４０Ｄ】図４０Ｄは、様々な濃度のａＴｃへの暴露後の、ＢＦＰ発現細胞のパーセンテージを経時的にプロットしたグラフを示す。
【図４１Ａ】図４１Ａは、ａＴｃと続いて１００μＭのＡＨＬへの暴露後の、ＹＦＰ発現細胞のパーセンテージを経時的にプロットしたグラフを示す。
【図４１Ｂ】図４１Ｂは、ａＴｃと続いて５０μＭのＡＨＬへの暴露後の、ＹＦＰ発現細胞のパーセンテージを経時的にプロットしたグラフを示す。
【図４１Ｃ】図４１Ｃは、ａＴｃと続いて１０μＭのＡＨＬへの暴露後の、ＹＦＰ発現細

胞のパーセンテージを経時的にプロットしたグラフを示す。
【図４１Ｄ】図４１Ｄは、ａＴｃと続いて１μＭのＡＨＬへの暴露後の、ＹＦＰ発現細胞のパーセンテージを経時的にプロットしたグラフを示す。
【図４１Ｅ】図４１Ｅは、ａＴｃと続いて様々な濃度のＡＨＬへの暴露後の、ＹＦＰ発現細胞のパーセンテージを経時的にプロットしたグラフを示す。
【００２３】
発明の詳細な説明
本明細書で提供されるのは、単一細胞内に、合成論理と、付随するＤＮＡがコードするメモリの保存とをアセンブルするための、効率的戦略およびプログラミング言語である。本明細書に記載のモジュール式ＤＮＡアセンブリ戦略は、論理関数の簡単な「プラグアンドプレイ式」コード化と、ＤＮＡに情報を「書き込む」という、リコンビナーゼの能力から生じる付随するメモリを可能とする。ＤＮＡに基づくメモリは長期記憶装置の便利な実装であり、なぜならば、これは細胞の複数世代に渡って自然に伝播され、細胞死の後にも安定であり得るからである［９，１０］。
本発明の統合論理／メモリシステムは、様々な向きで出力核酸（例えば、タンパク質産物をコードする遺伝子）に作動可能に連結された、または条件付きで作動可能に連結された少なくとも１つのプロモーター、および任意に少なくとも１つの一方向性ターミネーターを含む、単一の遺伝子回路構築物である、論理ゲートで構成されている（図１）。システムは、化学的誘導物質の入力を使用して、誘導性プロモーターからの直交リコンビナーゼの発現を駆動する。リコンビナーゼは、次に、ＤＮＡの反転または切除のための、遺伝子回路構築物におけるプロモーター、ターミネーターおよび／または出力核酸配列に隣接する認識部位を標的とし、出力核酸配列の条件付きの発現がもたらされる。
【００２４】
本発明の特徴は、入力が取り消された後に、論理ゲートが、安定した出力メモリを維持することである。この特徴を用いて、ハイスループットシークエンシング技術を使用して、多重化方式で問い合わせることができる状態を有するバイオセンサを作製することができる。さらに、リコンビナーゼに基づく計算の挙動を支配する、本明細書で提供されるプログラミング言語は、自動化遺伝子回路設計アルゴリズムと互換性がある［２２］。
【００２５】
論理／メモリシステムおよび論理ゲート
ブール論理関数は、想像可能な任意のデジタル構成要素を実行する関数の組み合わせをアセンブルするために使用可能な、論理ゲートに基づく。本発明は、任意のブール論理関数と、遺伝的事象（例えば、組換え）のＤＮＡに基づく安定したメモリの、ワンステップのアセンブリを提供する。本発明は、生細胞における統合論理／メモリのための、２または３以上の遺伝子に基づく論理ゲートのアセンブリを企図する。論理ゲートの基本的な「遺伝子エレメント」は表１に列挙され、各論理ゲートは、これらの遺伝子エレメントの少なくとも２種の組み合わせを含む。
論理ゲートのセットを、図２に示す。図２の各パネルは、合成論理／メモリシステム（全１６のシステム／パネル）の代表であり、各システムは以下を含む：（ａ）Bxb1リコンビナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結されたＮ－アシルホモセリンラクトン（ＡＨＬ）誘導性プロモーターを含む遺伝子構築物（図示せず）、（ｂ）phiC31リコンビナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結されたアンヒドロテトラサイクリン（ａＴｃ）誘導性プロモーターを含む遺伝子構築物（図示せず）、および（ｃ）１６の論理ゲートの１つ（図示）。図２の各パネルは、１６の論理ゲートの１つを含む：ＮＯＴ、ＡＮＤ、ＯＲ、ＮＯＴ、ＮＯＲ、ＮＡＮＤ、ＸＯＲ、ＸＮＯＲ、Ａ ＩＭＰＬＹ Ｂ、Ｂ ＩＭＰＬＹ Ａ、Ａ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ、Ｂ ＮＩＭＰＬＹ Ａ、Ａ、Ｂ、ＦＡＬＳＥまたはＴＲＵＥ。
【００２６】

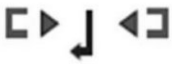
【表１－１】

表1：合成論理／メモリシステムの遺伝子エレメントの非限定的例

遺伝子エレメント	記号	説明
プロモーター		コード鎖上5’から3’方向に向いた構成的活性型プロモーター
反転プロモーター		非コード鎖上5’から3’方向に向いた構成的活性型プロモーター
隣接プロモーターI		コード鎖上5’から3’方向に向き、相補的組換え認識部位Bxb1 *attB*とBxb1 *attP*が隣接する、構成的活性型プロモーター
隣接プロモーターII		コード鎖上5’から3’方向に向き、相補的組換え認識部位phiC31 *attB*とphiC31 *attP*が隣接する、構成的活性型プロモーター

【００２７】

【表１－２】

反転隣接プロモーターI		非コード鎖上5’から3’方向に向き、Bxb1 *attB* とBxb1 *attP* が隣接する、構成的活性型プロモーター
反転隣接プロモーターII		非コード鎖上5’から3’方向に向き、phiC31 *attB* とphiC31 *attP* が隣接する、構成的活性型プロモーター
反転二重隣接プロモーター		非コード鎖上5’から3’方向に向き、Bxb1 *attB* とBxb1 *attP* およびphiC31 *attB* とphiC31 *attP* が隣接する、構成的活性型プロモーター
反転隣接ターミネーターI		非コード鎖上5’から3’方向に向き、Bxb1 *attB* とBxb1 *attP* が隣接する、転写ターミネーター
反転隣接ターミネーターII		非コード鎖上5’から3’方向に向き、phiC31 *attB* とphiC31 *attP* が隣接する、一方向性転写ターミネーター
出力核酸		コード鎖上5’から3’方向に向いた出力核酸
隣接出力核酸		コード鎖上5’から3’方向に向き、Bxb1 *attB* とBxb1 *attP* が隣接する、出力核酸
反転隣接出力核酸		非コード鎖上5’から3’方向に向き、Bxb1 *attB* とBxb1 *attP* が隣接する、出力核酸
二重隣接出力核酸		コード鎖上5’から3’方向に向き、Bxb1 *attB* とBxb1 *attP* およびphiC31 *attB* とphiC31 *attP* が隣接する、出力核酸

【００２８】

図２の論理ゲートは、入力ＡおよびＢに関して記載されている。本明細書に記載の例示的な態様において、入力Ａは、論理／メモリシステムへのＡＨＬの添加を表し、これはBxb1リコンビナーゼの発現を誘導し、これは次に相補的Bxb1 attB（フォワード）およびBxb

1 attP（リバース）組換え認識部位（図２では三角形として図式化）の組換えを触媒する。本明細書に記載の例示的な態様において、入力Ｂは、システムへのａＴｃの添加を表し、これはphiC31リコンビナーゼの発現を誘導し、これは次に相補的phiC31 attB（フォワード）およびphiC31 attP（リバース）組換え認識部位（図２では括弧として図式化）の組換えを触媒する。ＡＨＬおよびａＴｃは、本明細書に記載の論理ゲートの入力の例であることを理解すべきである。本発明は別の入力の使用も企図しており、これらはエンドユーザーによって選択され、ＡＨＬおよびａＴｃと共に、またはこれらの代わりに交換可能に使用することができる。

【００２９】

リコンビナーゼのBxb1とphiC31（およびそれらの同族認識部位）は、本発明に従って使用してよいリコンビナーゼ（および認識部位）の例であることを理解すべきである。本発明は、別のリコンビナーゼ／認識部位の使用も企図しており、これらはエンドユーザーによって選択することができ、Bxb1およびphiC31と共に、またはこれらの代わりに交換可能に使用して、ＤＮＡの反転または切除を触媒することができる。他のリコンビナーゼ／認識部位の例を以下に記載する。さらに、図２に示す出力核酸配列であるgfpは、タンパク質産物である緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードするが、gfpは、任意の出力核酸配列で置換されてもよいことが理解されるべきである。

【００３０】

本発明の１６個の論理のゲート（ＡＮＤ、ＯＲ、ＮＯＴ Ａ、ＮＯＴ Ｂ、ＮＯＲ、ＮＡＮＤ、ＸＯＲ、ＸＮＯＲ、Ａ ＩＭＰＬＹ Ｂ、Ｂ ＩＭＰＬＹ Ａ、Ａ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ、Ｂ ＮＩＭＰＬＹ Ａ、Ａ、Ｂ、ＦＡＬＳＥ、およびＴＲＵＥ）を以下に記載するが、これらは全ての２入力ブール論理関数を提供する。「２入力」ブール論理関数を含む論理ゲートとしては、ＡＮＤ、ＯＲ、ＮＯＲ、ＮＡＮＤ、ＸＯＲ、ＸＮＯＲ、Ａ ＩＭＰＬＹ Ｂ、Ｂ ＩＭＰＬＹ Ａ、Ａ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ、およびＢ ＮＩＭＰＬＹ Ａが挙げられる。したがって、１つの論理ゲートまたは複数の論理ゲートは、１つの論理ゲートまたは複数の論理ゲートがＡＮＤ、ＯＲ、ＮＯＲ、ＮＡＮＤ、ＸＯＲ、ＸＮＯＲ、Ａ ＩＭＰＬＹ Ｂ、Ｂ ＩＭＰＬＹ Ａ、Ａ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ、およびＢ ＮＩＭＰＬＹ Ａを含む場合に、全ての２入力のブール論理関数を提供すると考えられる。しかし本発明の個々の論理ゲートは、図２に示す遺伝子回路構築物に限定されるものではない。任意の数の表１の遺伝子エレメントを、論理ゲートの所与の遺伝子回路構築物中に様々な位置および向きに配置して、所望の出力を達成することができる。例えば、論理ゲートＮＯＲ、ＡＮＤおよびＸＯＲのための代替の遺伝子回路構築物は、図３に示される。

本明細書において、プロモーターは、核酸配列の転写開始および／または発現を制御する（「駆動する」）ためにそれが調節する前記配列との関連で、正しい機能的位置および向きにある場合に、「作動可能に連結されている」と考えられる。プロモーターは、遺伝子組換え事象の際に、それが調節する核酸配列に対して正しい機能的位置および向きに配置されている場合、「条件付きで作動可能に連結されている」と言われる。

【００３１】

「反転」遺伝子エレメント（例えば、反転プロモーター、反転ターミネーター、反転出力核酸配列）とは、逆向きになっていて、かつてのコード（センス）鎖が現在は非コード（アンチセンス）鎖となっているものである。その反転した逆向きにおいて、遺伝子エレメントは非機能性である（例えば、出力核酸配列などの別の遺伝子エレメントに作動可能に結合していない）。遺伝子エレメントの機能は、隣接する相補的認識部位の組換えと、それに続く、遺伝子エレメントの正しい向きへの反転により、回復することができる。したがって、組換え認識部位が隣接している反転プロモーターが、下流の出力核酸配列に「条件付きで作動可能に連結されている」と考えることができるのは、隣接する相補的認識部位の組換えの際に、プロモーターが、かつての非コード鎖が現在はコード鎖であるものとなるような向きであり、プロモーターが出力核酸配列の転写開始および／または発現を制御可能である場合である。同様に、組換え認識部位が隣接している反転出力核酸配列が、上流プロモーターに「条件付きで作動可能に連結されている」と考えることができるの

は、隣接する相補的認識部位の組換えの際に、出力核酸配列が、かつての非コード鎖が現在はコード鎖であるものとなるような向きであり、上流プロモーターが出力核酸の転写開始および／または発現を制御可能である場合である。出力核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターの具体例は、図２のＮＯＲ、ＮＡＮＤ、ＴＲＵＥ、ＮＯＴ Ａ、ＮＯＴ ＢおよびＸＮＯＲ論理ゲートに示されている。出力核酸配列に条件付きで作動可能に連結されたプロモーターの具体例は、図２のＡＮＤ、ＯＲ、Ａ、Ｂ、Ａ ＮＩＭＰＬＹ Ｂ、Ｂ ＮＩＭＰＬＹ ＡおよびＸＯＲ論理ゲートに示されている。論理ゲートＡ ＩＭＰＬＹ ＢおよびＢ ＩＭＰＬＹ Ａは、出力核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターと、出力核酸配列に条件付きで作動可能に連結されたプロモーターの両方を含む。

本明細書において、出力核酸配列が遺伝子エレメントの下流であると考えられるのは、出力核酸配列がコード（センス）鎖の３’末端近くに配置されており、遺伝子エレメントが５’末端近くに配置されている場合である。１つの遺伝子エレメントが別の遺伝子エレメントに対して「直ぐ下流」であると考えられるのは、２つの遺伝子エレメントが互いに近接している場合である（例えば、表１に列挙したような他の遺伝子エレメントが、この２つの間に存在しない）。

【００３２】

ＮＯＴゲート

最も単純なブール論理ゲートは、ＮＯＴゲートと呼ばれる。これは、1つの入力を受け取り、出力としてその逆を生成する。本明細書に開示されるのは、典型的なＮＯＴ Ａ論理ゲートおよびＮＯＴ Ｂ論理ゲートであり、ここでＡ（ＡＨＬ）およびＢ（ａＴｃ）が入力である（図２）。図２のＮＯＴ Ａゲートは、相補的リコンビナーゼ認識部位Bxb1 attBおよびBxb1 attPが隣接する出力核酸配列gfpに作動可能に連結された構成的プロモーター（簡略化のために本明細書において単にプロモーターと言及される）を含む。ＡＨＬがシステムに加えられると、Bxb1リコンビナーゼが発現され、Bxb1 attBとBxb1 attPが組換えられ、gfpの反転が生じて、その転写がもはやプロモーターによって制御されなくなる。逆に、ＡＨＬではなくａＴｃがシステムに加えられると、Bxb1リコンビナーゼは発現されず、Bxb1 attBとBxb1 attPは組換えられず、プロモーターはgfpの転写を制御する。したがってＧＦＰは、ＡＨＬの不在下でのみ、発現される。

【００３３】

図２のＮＯＴ Ｂゲートは、相補的リコンビナーゼ認識部位phiC31 attBおよびphiC31 attPが隣接しており、かつgfpに作動可能に連結されたプロモーターを含む。ａＴｃがシステムに加えられると、phiC31リコンビナーゼが発現され、phiC31 attBとphiC31 attPが組換えられ、プロモーターの反転が生じて、プロモーターはもはやgfpの転写を制御しない。逆に、ａＴｃではなくＡＨＬがシステムに加えられると、phiC31リコンビナーゼは発現されず、phiC31 attBとphiC31 attPは組換えられず、プロモーターはgfpの転写を制御する。したがってＧＦＰは、ａＴｃの不在下でのみ、発現される。

【００３４】

ＡＮＤゲート

ＡＮＤゲートは、別の単純なブール論理ゲートである。これは、２つの入力ＡおよびＢについて、論理「ａｎｄ」演算を行う。図２のＡＮＤゲートは、Bxb1 attBとBxb1 attPが隣接している反転gfpに条件付きで作動可能に連結された、phiC31 attBとphiC31 attPが隣接している反転プロモーターを含む。ＡＨＬのみがシステムに加えられると、Bxb1リコンビナーゼが発現され、Bxb1 attBとBxb1 attPが組換えられて、gfpをコード鎖に沿って５’から３’方向に配向させる；しかしphiC31 attBとphiC31 attPの組換えを活性化するａＴｃなしでは、プロモーターは反転のままであり、gfpの転写を制御できない。同様に、ａＴｃのみがシステムに加えられると、phiC31リコンビナーゼが発現され、phiC31 attBとphiC31 attPが組換えられて、プロモーターをコード鎖に沿って５’から３’方向に配向させる；しかしBxb1 attBとBxb1 attPの組換えを活性化するＡＨＬなしでは、gfpは反転のままである。したがってＧＦＰは、ＡＨＬおよびａＴｃ両方の存在下でのみ、発現される。

【００３５】
ＯＲゲート
ＯＲゲートは、入力Ａまたは入力Ｂについて論理「ｏｒ」演算を実行する。図２のＯＲゲートは、phiC31 attBとphiC31 attPが隣接している反転プロモーターの上流に、Bxb1 attBとBxb1 attPが隣接している反転プロモーターを含み、各反転プロモーターは、gfpに条件付きで作動可能に連結されている。ＡＨＬがシステムに加えられると、Bxb1リコンビナーゼが発現され、Bxb1 attBとBxb1 attPが組換えられて、プロモーターをコード鎖に沿って５’から３’方向に配向させてgfpの転写を制御する。同様に、ａＴｃがシステムに加えられると、phiC31リコンビナーゼが発現され、phiC31 attBとphiC31 attPが組換えられて、別のプロモーターをコード鎖に沿って５’から３’方向に配向させてgfpの転写を制御する；こうしてＧＦＰは、ＡＨＬまたはａＴｃまたは両方の存在下で、発現される。
【００３６】
ＮＯＲゲート
ＮＯＲゲートは、ＯＲゲートとＮＯＴゲートの組み合わせである。図２のＮＯＲゲートは、gfpに作動可能に連結されたプロモーターと、それらの間に位置する２つの反転ターミネーターであって、それぞれのターミネーターが異なる相補的リコンビナーゼ認識部位に隣接しているものを含む。ＡＨＬがシステムに加えられると、Bxb1リコンビナーゼが発現され、Bxb1 attBとBxb1 attPが組換えられて、ターミネーターをコード鎖に沿って５’から３’方向に配向させ、これによってgfpの転写を終結させる。同様に、ａＴｃがシステムに加えられると、phiC31リコンビナーゼが発現され、phiC31 attBとphiC31 attPが組換えられて、別のターミネーターをコード鎖に沿って５’から３’方向に配向させ、再度、gfpの転写を終結させる。したがって、ＧＦＰは、ＡＨＬとａＴｃ両方の不在下においてのみ、発現される。
【００３７】
ＮＡＮＤゲート
ＮＡＮＤゲートは、ＡＮＤゲートとＮＯＴゲートの組み合わせである。図２のＮＡＮＤゲートはgfpに作動可能に連結された２つのプロモーターを含み、各プロモーターには、異なる相補的リコンビナーゼ認識部位が隣接している。ＡＨＬのみがシステムに加えられると、Bxb1リコンビナーゼが発現され、Bxb1 attBとBxb1 attPが組換えられて上流プロモーターを反転させる；しかしphiC31 attBとphiC31 attPの組換えを活性化するａＴｃなしでは、下流プロモーターは作動可能に連結されたままであり、gfpの転写を制御している。同様に、ａＴｃのみがシステムに加えられると、phiC31リコンビナーゼが発現され、phiC31 attBとphiC31 attPが組換えられて下流プロモーターを反転させる；しかしBxb1 attBとBxb1 attPの組換えを活性化するＡＨＬなしでは、上流プロモーターは作動可能に連結されたままであり、gfpの転写を制御している。ＡＨＬとａＴｃ両方がシステムに加えられると、両方のプロモーターが反転され、どちらもgfpの転写を制御しない。したがって、ＡＨＬおよびａＴｃが同時にシステムに存在しない限り、ＧＦＰは発現される。
【００３８】
ＸＯＲゲート
ＸＯＲゲートは、「排他的ｏｒ」ゲートである。図２のＸＯＲゲートは、gfpに条件付きで作動可能に連結され、Bxb1 attBとBxb1 attPおよびphiC31 attBとphiC31 attPが隣接している、反転プロモーターを含む。ＡＨＬのみがシステムに加えられると、Bxb1リコンビナーゼが発現され、Bxb1 attBとBxb1 attPが組換えられ、プロモーターをコード鎖に沿って５’から３’方向に配向させて、gfpの転写を制御する。同様に、ａＴｃのみがシステムに加えられると、phiC31リコンビナーゼが発現され、phiC31 attBとphiC31 attPが組換えられ、プロモーターをコード鎖に沿って５’から３’方向に配向させて、gfpの転写を制御する。対照的に、ＡＨＬとａＴｃの両方がシステムに加えられると、２つの組換え事象が起こる：１つ目はプロモーターをコード鎖に沿って５’から３’方向に配向させ、２番目はプロモーターを非コード鎖に沿った作動不能な位置に反転させて、gfpの転写の制御を不能にする。したがってＧＦＰは、ＡＨＬまたはａＴｃがシステムに存在する場合

にのみ発現されるが、両方が存在する場合は発現されない。

【００３９】

ＸＮＯＲゲート

ＸＮＯＲゲートは、「排他的ｎｏｒ」ゲートである。図２のＸＮＯＲゲートは、gfpに作動可能に連結されたプロモーターを含み、gfpにはBxb1 attBとBxb1 attPおよびphiC31 attBとphiC31 attPが隣接している。ＡＨＬのみがシステムに加えられると、Bxb1リコンビナーゼが発現され、Bxb1 attBとBxb1 attPが組換えられて、gfpを非コード鎖に沿って反転させ、ここでgfpはプロモーターによって制御されない。同様に、ａＴｃのみがシステムに加えられると、phiC31リコンビナーゼが発現され、phiC31 attBとphiC31 attPが組換えられて、gfpを非コード鎖に沿って反転させる。対照的に、ＡＨＬとａＴｃの両方がシステムに加えられると、２つの組換え事象が起こる：１つ目はgfpを非コード鎖に沿って反転させ、２番目はgfpをコード鎖に沿った作動可能な位置に配向させて戻し、プロモーターによって制御されるようにする。したがってＧＦＰは、ＡＨＬとａＴｃ両方がシステムに存在する場合に、または両方がシステムに不在の場合に発現される。

【００４０】

ＩＭＰＬＹゲート

本発明はまた、Ａ ＩＭＰＬＹ Ｂゲート（Ａ ＡＮＤ ＮＯＴ Ｂ）およびＢ ＩＭＰＬＹ Ａゲート（Ｂ ＡＮＤ ＮＯＴ Ａ）を提供する。図２のＡ ＩＭＰＬＹ Ｂゲートは、（gfpに作動可能に連結され）Bxb1 attBとBxb1 attPが隣接しているプロモーター、および（gfpに条件付きで作動可能に連結され）それの間に位置する、phiC31 attBとphiC31 attPが隣接している反転プロモーターを含む。ＡＨＬのみがシステムに加えられると、上流プロモーターが反転され、gfpは転写されない。ａＴｃがシステムに加えられると、下流プロモーターがコード鎖に沿って５’から３’方向に配向されて、gfpの転写を制御する。したがってＧＦＰは、ａＴｃが存在する場合、ＡＨＬとａＴｃ両方が存在する場合、または両方が不在の場合に発現される；しかし、ＧＦＰは、ＡＨＬのみが存在する場合には発現されない。

対照的に、図２のＢ ＩＭＰＬＹ Ａゲートは、（gfpに作動可能に連結され）phiC31 attBとphiC31 attPが隣接しているプロモーターの上流に位置する、（gfpに条件付きで作動可能に連結され）Bxb1 attBとBxb1 attPが隣接している反転プロモーターを含む。ＡＨＬがシステムに加えられると、上流プロモーターがコード鎖に沿って５’から３’方向に配向されて、gfpの転写を制御する。ａＴｃがシステムに加えられると、下流プロモーターが反転されて、gfpは転写されない。したがって、ＧＦＰは、ＡＨＬの存在下、ＡＨＬとａＴｃ両方の存在下、または両方の不在の場合に発現される；しかし、ＧＦＰは、ａＴｃのみが存在する場合には発現されない。

【００４１】

ＮＩＭＰＬＹゲート

本発明はまた、Ａ ＮＩＭＰＬＹ ＢゲートおよびＢ ＮＩＭＰＬＹ Ａゲートも提供する。図２のＡ ＮＩＭＰＬＹ Ｂゲートは、phiC31 attBとphiC31 attPに隣接しており、Bxb1 attBとBxb1 attPが隣接している反転gfpに条件付きで作動可能に連結されたプロモーターを含む。ａＴｃがシステムに加えられると、上流プロモーターが反転されて、gfpは転写されない。ＡＨＬがシステムに加えられると、gfpがコード鎖に沿って５’から３’方向に配向されて、転写される。したがって、ＧＦＰは、ＡＨＬのみの存在下で発現される。

対照的に、Ｂ ＮＩＭＰＬＹ Ａゲートは、phiC31 attBとphiC31 attPが隣接しておりgfpに条件付きで作動可能に連結された反転プロモーター、およびその間に位置する、Bxb1 attBとBxb1 attPが隣接している反転ターミネーターを含む。ａＴｃがシステムに加えられると、上流プロモーターがコード鎖に沿って５’から３’方向に配向されて、gfpが転写される。ＡＨＬがシステムに加えられると、ターミネーターコード鎖に沿って５’から３’方向に配向されて、gfpは転写されない。したがってＧＦＰは、ａＴｃのみの存在下で発現される。

【００４２】
ＡゲートおよびＢゲート
本発明はまた、ＡゲートおよびＢゲートを提供する。図２のＡゲートは、Bxb1 attBとBxb1 attPに隣接している反転gfpに条件付きで作動可能に連結したプロモーターを含む。ＧＦＰは、ＡＨＬがシステムに存在する場合に発現される。図２のＢゲートは、phiC31 attBとphiC31 attPに隣接しており、gfpに条件付きで作動可能に連結したプロモーターを含む。ＧＦＰは、ａＴｃがシステムに加えられた場合に発現される。
【００４３】
ＴＲＵＥゲートおよびＦＡＬＳＥゲート
本発明はまた、ＴＲＵＥゲートおよびＦＡＬＳＥゲートを提供する。図２のＴＲＵＥゲートは、gfpに作動可能に連結したプロモーターを含む。ＧＦＰは、システムへの入力とは無関係に発現される。本発明のＦＡＬＳＥゲートは、反転プロモーターのすぐ下流の（例えば隣接している）gfpを含む。ＧＦＰが発現されることはなく、これも、システムへの入力とは無関係である。
【００４４】
リコンビナーゼおよび組換え認識配列
本明細書で提供されるのは、本発明の論理／メモリシステムに対して安定したＤＮＡベースのメモリを付与するために使用される、リコンビナーゼである。本明細書で使用する「リコンビナーゼ」は、短いＤＮＡ配列（単数または複数）を認識する部位特異的な酵素であり、ここでこの配列（単数または複数）は典型的には約３０塩基対（ｂｐ）～４０ｂｐの間であってこれらのリコンビナーゼ認識配列間の組換えを媒介し、これにより、リコンビナーゼ認識配列間でＤＮＡ断片の切除、統合、反転、または交換がもたらされる。本明細書で使用する「遺伝子エレメント」は、遺伝子発現における役割を有するＤＮＡの配列を指す。例えば、プロモーター、転写ターミネーター、および、生成物（例えば、タンパク質産物）をコードする核酸は、それぞれ遺伝子エレメントであると考えられる。
【００４５】
リコンビナーゼは、明確な生化学的特性に基づいて、２つの異なるファミリー：セリンリコンビナーゼ（例えば、リゾルバーゼおよびインベルターゼ）およびチロシンリコンビナーゼ（例えば、インテグラーゼ）に分類することができる。セリンリコンビナーゼおよびチロシンリコンビナーゼはさらに、双方向リコンビナーゼと一方向リコンビナーゼに分類される。双方向セリンリコンビナーゼの例は、限定はされないが、β－６、CinH、ParAおよびγδを含む；一方向セリンリコンビナーゼの例は、限定はされないが、Bxb1、φC31、TP901、TG1、φBT1、R4、φRV1、φFC1、MR11、A118、U153およびgp29を含む。双方向チロシンリコンビナーゼの例は、限定はされないが、Cre、FLP、およびRを含む；一方向チロシンリコンビナーゼは、限定はされないが、ラムダ、HK101、HK022およびpSAM2を含む。セリンおよびチロシンリコンビナーゼの名称は、リコンビナーゼがＤＮＡをアタックするために使用し、鎖交換の際にＤＮＡに共有結合した状態となる、保存された求核性アミノ酸残基に由来する。リコンビナーゼは多数の標準的な生物学的用途に使用されており、例えば遺伝子ノックアウトの作製およびソーティング問題の解決を含む［３５－３８］。
【００４６】
組換えの結果は、組換えられるべき、典型的には３０ｂｐ未満の、２つの短い反復ＤＮＡ配列の位置および向きに部分的に依存する。リコンビナーゼは、各リコンビナーゼに特異的で、本明細書では「リコンビナーゼ認識配列」または「リコンビナーゼ認識部位」とも称される、これらの反復配列に結合する。したがって、本明細書で使用する場合、リコンビナーゼがリコンビナーゼ認識部位に対して「特異的」であるのは、リコンビナーゼが反復ＤＮＡ配列間の反転または切除を媒介することができる場合である。本明細書で使用する場合、リコンビナーゼはまた、介在する遺伝子エレメント（例えば、プロモーター、ターミネーター、または出力核酸配列）に隣接するその「同族リコンビナーゼ認識部位」を認識すると言うこともできる。遺伝子エレメントは、エレメントが２つの反復ＤＮＡ配

列の間に位置し直接隣接している場合に、リコンビナーゼ認識部位に「隣接」していると言う。いくつかの態様において、リコンビナーゼ認識部位は、互いに重ならない。しかしながら別の態様において、リコンビナーゼ認識部位は、本明細書に以下に記載のように互いに重なり（例えば、例５に記載の回路を参照）、これは組合せの複雑さを大幅に増加させ得る。

【００４７】

反転組換えは、２つの短い反転かつ反復ＤＮＡ配列の間で起こる。ＤＮＡ屈曲タンパク質（DNA bending protein）によって支援されるＤＮＡループの形成は２つの反復配列を１つにし、その点においてＤＮＡ切断およびライゲーションが発生する。この反応はＡＴＰに依存せず、超らせんＤＮＡを必要とする。このような反転組換え事象の最終結果は、反復部位の間のＤＮＡのストレッチが反転して（すなわち、ＤＮＡのストレッチが向きを反転させて）、コード鎖は非コード鎖になり、またその逆も成立する。かかる反応において、ＤＮＡは正味の増加（gain）なし、またはＤＮＡの損失なしで保存される。

逆に、統合（切除）組換えは、同一方向に配向された２つの短い反復ＤＮＡ配列の間で起こる。この場合、介在ＤＮＡは切除／除去される。例えば、切除のために指向され、プロモーターとＧＦＰコード配列などの出力が隣接しているリコンビナーゼ部位の２つの異なるセットのそれぞれの間にターミネーターを配置することによって、ＡＮＤゲートをアセンブルすることができる。この例において、両方のターミネーターは、プロモーターからＧＦＰコード配列へのリードスルー（read through）を可能にするために、リコンビナーゼ（単数または複数）の入力に依存する作用によって切除されねばならない。このように、両方のターミネーターを切除して出力を生成するために、２つの入力が必要である。

【００４８】

リコンビナーゼはまた、不可逆的または可逆的により分類することができる。本明細書で使用する「不可逆的リコンビナーゼ」は、２つの相補的組換え部位間の組換えを触媒することができるが、追加の因子の支援なしには、この組換えにより形成されたハイブリッド部位間の組換えを触媒することができないリコンビナーゼを指す。したがって、「不可逆的認識部位」とは、不可逆的リコンビナーゼのための２つのＤＮＡ認識配列の最初として機能することができ、かつ、その部位での組換えに続いてハイブリッド認識部位に改変される、リコンビナーゼ認識部位を指す。「相補的不可逆的認識部位」は、不可逆的リコンビナーゼのための２つのＤＮＡ認識配列の第２として機能することができ、かつ、その部位での相同組換えに続いてハイブリッド認識部位に改変される、リコンビナーゼ認識部位を指す。例えば、後述のattBおよびattPは、Bxb1およびphiC31リコンビナーゼのための不可逆的な組換え部位であり、attBは、attPの相補的な不可逆的組換え部位であり、またその逆も成り立つ。近年、attB／attP部位は突然変異されて、互いに相互作用のみはするが、他の変異体とは作用しない直交Ｂ／Ｐ対を生成することが示された［７２］。これにより、１つのリコンビナーゼが、複数の直交Ｂ／Ｐ対の切除または統合または反転を制御することが可能となる。

【００４９】

phiC31（φC31）インテグラーゼは、例えば、真核細胞では見られない付加的な因子の不在において、attB×attP反応のみを触媒する。リコンビナーゼは、attBとattP間の組換えの際に形成されるattLおよびattRハイブリッド組換え部位間の組換えを媒介することはできない。phiC31インテグラーゼなどのリコンビナーゼは、単独で逆反応を触媒することはできないため、phiC31のattB×attP組換えは安定である。

不可逆的リコンビナーゼ、および不可逆的リコンビナーゼをコードする核酸は、当技術分野において記載されており、日常的な方法を用いて得ることができる。不可逆的なリコンビナーゼの例としては、限定はされないが、phiC31（φC31）リコンビナーゼ（配列番号１１）、大腸菌ファージＰ４リコンビナーゼ［３９］、大腸菌ファージラムダインテグラーゼ［４０］、リステリアA118ファージリコンビナーゼ［４１］、およびアクチノファージR4 Sreリコンビナーゼ［４２］、HK101、HK022、pSAM2、Bxb1、TP901、TG1、φBT1、φRV1、φFC1、MR11、U153およびgp29が挙げられる。

【００５０】
反対に、「可逆的リコンビナーゼ」は、２つの相補的リコンビナーゼ認識部位間の組換えを触媒することができ、追加の因子の支援なしで最初の組換え事象によって形成された部位間の組換えを触媒することができて、これを逆転させる、リコンビナーゼを指す。組換えにより生成された産物の部位自体が、その後の組換えのための基質である。可逆的リコンビナーゼ系の例としては、限定はされないが、Cre-loxおよびflp-frt系、R、β－６、CinH、ParAおよびγδを含む。
本明細書で提供されるリコンビナーゼは、本発明の態様で使用することができるリコンビナーゼの排他的な例であることを意味しない。本発明の論理／メモリシステムの複雑さは、新しい直交リコンビナーゼのデータベースを利用すること、または定義されたＤＮＡ特異性を有する合成リコンビナーゼを設計することによって、拡張することができる［２０，２１］。本明細書に記載された合成論理／メモリシステムにおいて有用であるリコンビナーゼの他の例は、当業者に知られており、発見または生成される任意の新しいリコンビナーゼは、本発明の別の態様で使用可能であることが期待される。
【００５１】
いくつかの態様において、リコンビナーゼは、セリンリコンビナーゼである。したがって、いくつかの態様において、リコンビナーゼは不可逆的あると考えられる。いくつかの態様において、リコンビナーゼは、チロシンリコンビナーゼである。したがっていくつかの態様において、リコンビナーゼは可逆的であると考えられる。
いくつかの態様において、リコンビナーゼは、配列番号８（表２）に記載のBxb1リコンビナーゼの配列、および、それぞれ配列番号９と配列番号１０に記載の、対応するBxb1 attBおよびBxb1 attPリコンビナーゼ認識配列を含む。
いくつかの態様において、リコンビナーゼは、配列番号１１（表２）に記載のphiC31（φC31）リコンビナーゼの配列、および、それぞれ配列番号１２と配列番号１３に記載の、対応するphiC31 attBおよびphiC31 attPリコンビナーゼ認識配列を含む。
【００５２】
プロモーター
本明細書で提供されるのは、本発明の、リコンビナーゼに基づく合成論理／メモリシステムで使用するためのプロモーター配列（「プロモーター」）である。本明細書で使用する「プロモーター」は、核酸配列の調節領域であって、そこにおいて核酸配列の残りの転写の開始および速度が制御される領域を指す。プロモーターはまた、ＲＮＡポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節タンパク質および分子が結合することができるサブ領域も、含んでよい。プロモーターは、構成的、誘導的、活性化可能、抑制性、組織特異的、またはそれらの任意の組み合わせであってよい。
【００５３】
プロモーターは、それが調節する核酸配列の、発現を駆動するかまたは転写を駆動する。本明細書で使用する場合、「作動可能に連結された」および「制御下」とは、プロモーターが、配列の転写開始および／または発現を制御するためにそれが調節する核酸配列に対して、正確な機能的位置および／または向きにあることを示す。上記の「反転プロモーター」は、核酸配列が逆方向になっており、かつてコード鎖であったものが現在は非コード鎖、またはその逆であるようになっているところのプロモーターである。反転プロモーター配列は、本発明の様々な態様において、論理ゲートの状態を調節するために使用することができる（例えば、高出力、「オン」、または低／無出力、「オフ」）。したがって、いくつかの態様において、プロモーターは反転プロモーターであり、これには相補的なリコンビナーゼ認識部位が隣接しており、部位の組換えの際に正しい向きに反転して、作動可能に連結された核酸配列の発現を駆動するものである。本発明のいくつかの態様において、プロモーターは、プロモーターの下流の核酸配列の転写活性化に関与するシス作用調節配列を指す「エンハンサー」と共に使用してもよく、しなくてもよい。エンハンサーは、プロモーターおよび／またはコードされた核酸の、前または後の任意の機能的位置に配置することができる。

【００５４】
プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼ（および／またはシグマ因子）に対するその親和性に応じて、強弱として分類される；これは、プロモーター配列が、ポリメラーゼのための理想的なコンセンサス配列にどの程度類似しているかに関連する。プロモーターの強度は、転写の開始がそのプロモーターで、高または低頻度で起こるかどうかに依存し得る。異なる強度を有する異なるプロモーターを使用して、遺伝子出力発現の異なるデジタル設定可能レベルの論理ゲートを構築することができる（例えば、弱いプロモーターから開始される遺伝子発現のレベルは、強力なプロモーターから開始される遺伝子発現レベルよりも低い）。例えば、図２６Ａ～２６Ｃに示すデータは、入力された誘導物質の様々なデジタル組み合わせが、使用されるプロモーターの強度の変化およびそれぞれの出力の合計に基づいて、アナログ遺伝子発現出力の複数のレベルをもたらすことを実証する。
プロモーターは、遺伝子または配列と天然に関連するものであってもよく、例えば、所与の遺伝子または配列のコードセグメントおよび／またはエクソンの上流に位置する５’非コード配列を、単離することによって得られるものである。かかるプロモーターは、「内因性」と呼ぶことができる。同様にエンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列と天然に関連するものであってよい。
【００５５】
いくつかの態様において、コード核酸セグメントは、その自然の環境においてコードされた核酸配列に通常は関連しないプロモーターを指す、組換え型または異種プロモーターの制御下に配置してもよい。組換え型または異種エンハンサーとは、その自然の環境において核酸配列と通常は関連しないエンハンサーを指す。かかるプロモーターまたはエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー；他の原核生物、ウイルスまたは真核生物細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー；および「天然に存在」しない合成プロモーターまたはエンハンサー、例えば、異なる転写調節領域の異なるエレメントを、および／または当該技術分野で知られている遺伝子工学の方法によって発現を変化させる変異を含有するものなどを含むことができる。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成的に生成することに加えて、ＰＣＲを含む組換えクローニングおよび／または核酸増幅技術を、本明細書に開示された論理ゲートに関連して用いて、配列を生産することができる（米国特許第4,683,202号および米国特許第5,928,906号参照）。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などの非核細胞小器官内での配列の転写および／または発現を導く制御配列を、本発明に従って使用することができる。
【００５６】
誘導性プロモーター
本明細書で使用する「誘導性プロモーター」とは、誘導物質または誘導剤が存在する場合、またはその影響によるかもしくはそれとの接触がある場合に、転写活性を開始するかまたは増強することを特徴とするものである。「誘導物質」または「誘導剤」とは、内因性であるか、または通常は外因性化合物もしくはタンパク質であって、誘導性プロモーターの転写活性の誘導に活性であるような方法で投与されるものでもよい。
本発明に従って使用するための誘導性プロモーターは、原核生物および真核生物両方の宿主生物において機能することができる。いくつかの態様において、哺乳動物の誘導性プロモーターが使用される。本明細書で使用するための哺乳動物誘導性プロモーターの例は、限定はされないが、以下を含む：プロモーター型P_{Act}：P_{AIR}、P_{ART}、P_{BIT}、P_{CR5}、P_{CTA}、P_{ETR}、P_{NIC}、P_{PIP}、P_{ROP}、P_{SPA}／P_{SCA}、P_{TET}、P_{TtgR}、プロモーター型P_{Rep}：P_{CuO}、P_{ETR} ON8、P_{NIC}、P_{PIR} ON、P_{SCA} ON8、P_{TetO}、P_{UREX8}、プロモーター型P_{Hyb}：$tetO_7$-ETR_8-$P_{hCMVmin}$、$tetO_7$-PIR_3-ETR_8-$P_{hCMVmin}$、および$scbR_8$-PIR_3-$P_{hCMVmin}$。いくつかの態様において、他の生物由来の誘導性プロモーター、ならびに原核生物または真核生物の宿主内で機能するように設計された合成プロモーターを使用することができる。本明細書で使用するための非哺乳動物誘導性プロモーターの非限定的例としては、レンチウイルスプロモーター（例えば、EFα、CMV、ヒトシナプシンＩ（hSynI）、CaMKIIα、hGFAPおよびTPH-2）およびアデノ随伴ウイルスプロモーター（例えば、CaMKIIα（AAV5）、hSynI（AAV2）

、hThy1（AAV5）、fSST（AAV1）、hGFAP（AAV5、AAV8）、MBP（AAV8）、SST（AAV2））。本発明の誘導性プロモーターの１つの重要な機能的特徴は、外部から適用される誘導物質への曝露による、それらの誘導能である。

【００５７】

誘導物質の投与または除去は、作動可能に連結された核酸配列（例えば、リコンビナーゼをコードする核酸）の転写の「オン」または「オフ」状態の間の切替をもたらす。したがって、本明細書で使用される場合、核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターの「オン」状態は、プロモーターが核酸配列の転写を積極的に駆動している状態を指す（すなわち、連結された核酸配列が発現される）。逆に、核酸配列に作動可能に、または条件付きで作動可能に連結されたプロモーターの「オフ」状態は、プロモーターが核酸配列の転写を積極的に駆動していない状態を指す（すなわち、連結された核酸配列は発現されない）。

本発明に従って使用するための誘導性プロモーターは、１または２以上の生理学的条件、例えばｐＨ、温度、放射線、浸透圧、生理食塩水勾配、細胞表面結合、および１または２以上の外因性もしくは内因性の誘導剤の濃度などの変化により、誘導され得る（または抑制され得る）。外因性誘導物質または誘導剤は、限定はされないが、以下を含むことができる：アミノ酸およびアミノ酸類似体、糖類および多糖類、核酸、タンパク質転写アクチベーターおよびリプレッサー、サイトカイン、毒素、石油系化合物、金属含有化合物、塩類、イオン、酵素基質類似体、ホルモン、またはこれらの組み合わせ。誘導性プロモーターを誘導または抑制する状態（単数または複数）および／または薬剤（単数または複数）は、本明細書に記載の論理ゲートの入力（単数または複数）とすることができる。

【００５８】

本発明に従って使用するための誘導性プロモーターは、本明細書に記載の、または当業者に知られている、任意の誘導性プロモーターを含む。誘導性プロモーターの例としては、限定はされないが、以下を含む：化学的／生化学的に調節され、物理的に調節されたプロモーター、例えばアルコール調節性プロモーター、テトラサイクリン調節性プロモーター（例えば、アンヒドロテトラサイクリン（ａＴｃ）応答性プロモーターおよび他のテトラサイクリン応答性プロモーター系などであり、テトラサイクリンリプレッサータンパク質（ｔｅｔＲ）、テトラサイクリンオペレーター配列（ｔｅｔＯ）およびテトラサイクリントランスアクチベーター融合タンパク質（ｔＴＡ）を含む）、ステロイド調節性プロモーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体、ヒトエストロゲン受容体、および蛾のエクジソン受容体に基づくプロモーター、およびステロイド／レチノイド／甲状腺受容体スーパーファミリーからのプロモーター）、金属調節性プロモーター（例えば、酵母、マウスおよびヒトからの、メタロチオネイン（金属イオンに結合して封鎖するタンパク質）遺伝子由来のプロモーター）、病原調節性プロモーター（例えば、サリチル酸、エチレンまたはベンゾチアジアゾール（ＢＴＨ）により誘導される）、温度／熱誘導性プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター）、および光調節性プロモーター（例えば、植物細胞からの光反応性プロモーター）。

【００５９】

いくつかの態様において、本発明に従って使用される誘導物質は、Ｎ－アシルホモセリンラクトン（ＡＨＬ）であり、これは細菌のクオラムセンシングに関与するシグナル伝達分子のクラスである。クオラムセンシングは、集団密度に基づくグループベースの挙動の調整を可能にする、細菌間の通信方法である。ＡＨＬは細胞膜を横切って拡散し、ｐＨ値の範囲にわたって増殖培地中で安定である。ＡＨＬは、ＬｕｘＲなどの転写アクチベーターに結合し、同族プロモーターからの転写を刺激することができる。

いくつかの態様において、本発明に従って使用される誘導物質はアンヒドロテトラサイクリン（ａＴｃ）であり、これは、抗生物質活性を示さないテトラサイクリン誘導体であり、例えば細菌などの、テトラサイクリン制御型遺伝子発現系での使用が設計されている。

他の誘導性プロモーター系も、本発明に従って使用してよい。

【００６０】
ターミネーター
本発明に提供されるのは、本発明のいくつかの態様において使用するためのターミネーター配列である。本明細書で使用する「ターミネーター」または「ターミネーター配列」は、転写を停止させる核酸配列である。ターミネーターは、一方向性または二方向性であってよい。これは、ＲＮＡポリメラーゼによるＲＮＡ転写物の特異的終結に関与するＤＮＡ配列から構成される。ターミネーター配列は、上流のプロモーターによる下流の核酸配列の転写活性化を防ぐ。したがって、一定の態様において、ＲＮＡ転写物の産生を終了させるターミネーターが企図される。ターミネーターは、望ましい出力発現レベル（例えば、低出力レベル）を達成するために、in vivoで必要となり得る。
ターミネーターの最も一般的に使用されるタイプは、フォワードターミネーターである。通常に転写される核酸配列の下流に置かれた場合、フォワード転写ターミネーターは、転写の中止を引き起こす。いくつかの態様において、二方向性転写ターミネーターが提供され、これは通常、フォワード鎖およびリバース鎖両方での転写の終結を引き起こす。いくつかの態様において、リバースターミネーターが提供され、これは通常、リバース鎖での転写のみを終結させる。
【００６１】
原核生物系において、ターミネーターは、通常２つのカテゴリー、（１）ρ非依存性ターミネーターおよび（２）ρ依存性ターミネーターに分類される。ρ非依存性ターミネーターは一般に、豊富なＧＣ塩基対といくつかのＴ塩基によるステムループを形成する、パリンドローム配列で構成されている。理論に束縛されることを望まないが、転写終結の従来モデルは、ステムループがＲＮＡポリメラーゼの一時停止を引き起こし、ポリＡテールの転写が、ＲＮＡ：ＤＮＡ二重鎖の巻き戻しとＲＮＡポリメラーゼからの解離を引き起こすというものである。
真核生物系では、ターミネーター領域は、新しい転写物の部位特異的切断を可能にしてポリアデニル化部位を露出させる、特定のＤＮＡ配列を含むことができる。これは、特殊な内因性ポリメラーゼに、転写物の３’末端に約２００Ａ残基（ポリＡ）のストレッチを追加するためのシグナルを送る。このポリＡテールで修飾されたＲＮＡ分子は、より安定しているようであり、より効率的に翻訳される。したがって、真核生物に関連するいくつかの態様において、ターミネーターは、ＲＮＡの切断のためのシグナルを含むことができる。いくつかの態様において、ターミネーターシグナルは、メッセージのポリアデニル化を促進する。ターミネーターおよび／またはポリアデニル化部位エレメントは、出力核酸レベルを増強し、かつ／または核酸間のリードスルーを最小限に抑えるのに役立ち得る。
【００６２】
本発明に従って使用するためのターミネーターは、本明細書に記載のまたは当業者に知られている任意の転写ターミネーターを含む。ターミネーターの例としては、限定するものではないが、遺伝子の終結配列、例えばウシ成長ホルモンターミネーター、およびウイルス終結配列、例えばSV40ターミネーター、spy、yejM、SECG-leuU、thrLABC、rrnB T1、hisLGDCBHAFI、metZWV、rrnC、xapR、aspAおよびarcAターミネーターが挙げられる。いくつかの態様において、終結シグナルは、配列切断に起因するものなどの、転写または翻訳することができない配列であってもよい。
他の誘導性プロモーター系も、本発明に従って使用することができる。
【００６３】
出力核酸配列および出力産物
様々な出力核酸配列および出力産物が、本発明に従って使用するために提供される。本明細書で使用する場合、「出力産物」は、本明細書に記載の論理ゲートおよびシステムの特定の状態のマーカーとして使用できる遺伝子産物を指す。本発明の出力核酸配列は、特定の入力を受けて細胞の状態を追跡またはマークするために用いられるタンパク質またはＲＮＡを、コードすることができる。かかる出力産物は、細胞の種々の状態（例えば、「オン」または「オフ」）を区別するために使用することができる。本発明の論理／メモリ

システムのための代表的な出力産物としては、限定はされないが、レポータータンパク質、転写リプレッサー、転写アクチベーター、選択マーカー、酵素、受容体タンパク質、リガンドタンパク質、ＲＮＡ、リボスイッチ、ショートヘアピンＲＮＡおよびリコンビナーゼが挙げられる。本発明の側面は、複数の論理ゲート（例えば、少なくとも２つの論理ゲート）を含む論理／メモリシステムに関する。かかるシステムにおいて、各論理ゲートは、１または２種以上の異なる出力核酸（例えば、異なるかまたは固有の出力産物（単数または複数）をコードするもの）を含んでもよいことが理解されるべきである。したがって、単一の細胞またはシステムは、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１種以上の異なる出力核酸を含むことができる。

【００６４】

レポーター出力産物

いくつかの態様において、本発明の出力核酸配列は「レポーター」をコードできてもよい。本明細書で使用する場合、レポーターとは、遺伝子発現を測定し、蛍光、発光または色などの測定可能なシグナルを通常生成するために用いることができる、タンパク質を指す。細胞または生物中のレポーターの存在は、容易に観察される。例えば、蛍光タンパク質（例えばＧＦＰ）は、特定の波長の光で励起されると細胞の蛍光を引き起こし、ルシフェラーゼは、細胞に、光を生成する反応を触媒させ、βガラクトシダーゼなどの酵素は、基質を着色生成物に変換する。いくつかの態様において、レポーターは、本発明のシステムが受領した入力の強度または活性を定量するために使用してもよい。いくつかの態様において、レポーターを他のタンパク質のコード配列にインフレームで融合させて、タンパク質が細胞または生物中に位置する場所を特定することができる。本発明に従って使用するためのレポーターは、本明細書に記載のまたは当業者に知られている任意のレポーターを含む。

【００６５】

特定のレポーターおよび望ましい特性データの種類に応じて、レポーターを測定または定量化するいくつかの異なる方法がある。いくつかの態様において、顕微鏡法は、特に単一細胞レベルで、レポーター活性の空間的および時間的両方の情報を得るための有用な技術であり得る。いくつかの態様において、フローサイトメーターを使用して、細胞の大集団にわたってレポーター活性の分布を測定することができる。いくつかの態様において、プレートリーダーを使用して、時間の経過とともに多くの異なる試料の母集団の平均値の測定を行うことができる。いくつかの態様において、かかる様々な機能を組み合わせた機器、例えばフローサイトメーター用に設計された多重プレートリーダー、および組み合わせ顕微鏡法、およびフローサイトメトリー用機器を使用することができる。

蛍光タンパク質を使用して、論理ゲート／システムの出力を視覚化または定量化することができる。蛍光は、適当な波長の光で蛍光タンパク質を励起するように装備された、顕微鏡、プレートリーダーまたはフローサイトメーターを用いて、容易に定量することができる。いくつかの異なる蛍光タンパク質が利用可能であり、したがって複数の遺伝子発現の測定を並列に行うことができる。本発明に従って使用され得る蛍光タンパク質をコードする遺伝子の例としては、限定することなく、米国特許出願第2012/0003630号（表５９参照）に提供されているタンパク質を含み、この文書は参照により本明細書に組み込まれる。

【００６６】

ルシフェラーゼもまた、論理ゲート／システムの出力を視覚化または定量化するために、特に低レベルの遺伝子発現を測定するために用いることができ、これは、ルシフェラーゼの不在下では、細胞がごくわずかかまたは全くバックグラウンド発光を有しない傾向があるためである。発光は、プレートリーダーまたは発光カウンターを用いて容易に定量することができる。本発明に従って使用することができるルシフェラーゼをコードする遺伝子の例としては、限定はされないが、dmMyD88－リンカー－Rluc、dmMyD88－リンカー－Rluc－リンカー－PEST191、およびホタルルシフェラーゼ（Photinus pyralisからの）を含む。

着色された基質を生成する酵素（「比色酵素」）もまた、論理ゲート／システムの出力を視覚化または定量化するために使用することができる。酵素産物は、分光光度計またはプレートリーダーなどの吸光度測定が可能な他の機器を用いて、定量することができる。ルシフェラーゼと同様に、βガラクトシダーゼなどの酵素は、それらが低信号を増幅する傾向があるため、低レベルの遺伝子発現の測定に使用することができる。本発明に従って使用することができる比色酵素をコードする遺伝子の例としては、限定はされないが、lacZαフラグメント、lacZ（βガラクトシダーゼをコードするもの、完全長）、およびxylEを含む。

【００６７】

転写出力

いくつかの態様において、本発明の出力核酸配列は、転写アクチベーターまたはリプレッサーをコードすることができ、出力遺伝子によるその産生は、細胞状態にさらなる変化をもたらすことができ、その後のまたは追加の論理ゲートに付加的な入力信号を提供する。転写調節因子は、同族プロモーターからの転写を活性化するか、または抑制する。転写アクチベーターは、典型的には、近くの転写プロモーターに結合し、ＲＮＡポリメラーゼを募集して、直接転写を開始する。リプレッサーは、転写プロモーターに結合し、ＲＮＡポリメラーゼによる転写開始を立体的に妨げる。その他の転写調節因子は、それが結合する場所および細胞状態に応じて、アクチベーターまたはリプレッサーのいずれかとして機能する。本発明に従って使用するための転写調節因子は、本明細書に記載のまたは当業者に知られている任意の転写調節因子を含む。本発明に従って使用され得る転写調節因子をコードする遺伝子の例としては、限定することなく、米国特許出願第2012/0003630号（表６３参照）に提供されている調節因子を含み、この文書は参照により本明細書に組み込まれる。

【００６８】

選択マーカー出力

いくつかの態様において、本発明の出力核酸配列は、選択マーカーをコードできてもよい。本明細書で使用する場合、「選択マーカー」とは、細胞などの生物学的ユニットに選択的利点や欠点を付与する、タンパク質コード配列を指す。例えば、原核生物の選択マーカーの一般的な種類は、特定の抗生物質に対する耐性を付与するものである。こうして、この選択マーカーを有する細胞は、抗生物質の存在にもかかわらず、培地中で増殖することができる。例えば、ほとんどのプラスミドは抗生物質選択マーカーを含み、プラスミドが細胞複製および分裂の間に維持されることが保証されるが、これは、プラスミドのコピーを失う細胞は、抗生物質を補充した培地中においてすぐに死滅するかまたは増殖に失敗するかの、どちらかとなるからである。選択マーカーの第２の一般的な種類であって、多くの場合ポジティブ選択マーカーとも呼ばれるものは、細胞に対して毒性である。ポジティブ選択マーカーは、クローニングの間に、クローニングベクターで形質転換された細胞を選択するためにしばしば使用され、挿入物を含むプラスミドで形質転換された細胞のみとすることを確実にする。本発明に従って使用するための選択マーカーは、本明細書に記載のまたは当業者に知られている任意の選択マーカーを含む。本発明に従って使用することができる選択マーカーをコードする遺伝子の例としては、限定することなく、米国特許出願第2012/0003630号において提供されるマーカーを含み（表６４参照）、この文書は参照により本明細書に組み込まれる。

【００６９】

酵素出力

いくつかの態様において、本発明の出力核酸配列は、酵素をコードすることができる。いくつかの態様において、酵素は、特定の入力に対する応答として使用される。例えば、本発明の論理／メモリシステムが受領した特定の入力、例えば環境中に存在する一定範囲の毒素濃度などに応答して、システムは、毒素を分解または他の方法で破壊することができる酵素をコードする出力核酸配列を含む論理ゲートを、「オン」にすることができる。

いくつかの態様において、出力産物は、基質の生成物への変換を触媒する「生合成酵素

」であってよい。例えば、かかる生合成酵素を本発明に従って使用して、特定のシグナルに応答して有用な化学物質および材料を生産または分解する経路を組み立てることができる。これらの酵素の組み合わせは、天然または合成のいずれかの生合成経路を再構成することができる。これらの酵素は、特殊化学品、バイオ燃料やバイオレメディエーションにおける用途を有する。本発明に従って使用するための酵素は、本明細書に記載のまたは当業者に知られている任意の酵素を含む。本発明に従って使用することができる酵素をコードする遺伝子の例としては、限定はされないが、米国特許出願第2012/0003630号に提供されるものを含み、この文書は参照により本明細書に組み込まれる。

【００７０】

受容体、リガンドおよび溶解性タンパク質

いくつかの態様において、本発明の出力核酸配列は、受容体、リガンドまたは溶解性タンパク質をコードすることができる。受容体は３つのドメインを有する傾向がある：タンパク質、ペプチドまたは小分子などのリガンドを結合するための細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびリン酸化などのある種のシグナル伝達事象に頻繁に関与することができる、細胞内または細胞質ドメイン。いくつかの態様において、輸送体、チャネルまたはポンプは、出力産物として使用される。輸送体は、細胞膜を横切って物質の輸送を担う膜タンパク質である。チャンネルは、選択されたイオンがこれを通して拡散することができる、貫通孔を形成するタンパク質で構成される。ポンプは、能動輸送として知られているエネルギー依存プロセスにおいて、その勾配に抵抗して物質を移動させることができる膜タンパク質である。いくつかの態様において、その主な目的が他のタンパク質、イオン、小分子、および他のリガンドに結合することであるタンパク質およびタンパク質ドメインをコードする核酸配列は、本発明に従って使用することができる。本発明に従って使用するための受容体、リガンドおよび溶解性タンパク質は、本明細書に記載のまたは当業者に知られている任意の受容体、リガンドおよび溶解タンパク質を含む。本発明に従って使用することができる受容体、リガンドおよび溶解性タンパク質をコードする遺伝子の例としては、限定はされないが、米国特許出願第2012/0003630号に提供されるものを含み（表７３を参照）、この文書は参照により本明細書に組み込まれる。

【００７１】

論理ゲートおよびシステムの遺伝子工学

本発明の合成論理／メモリシステムでの使用のために操作される細胞は、任意の細胞または宿主細胞であってよい。本明細書中で定義されるように、「細胞」または「細胞系」とは、全ての既知の独立した生物の基本的な構造的および機能的単位である。それは、生物として分類される生命の最小単位である。例えば、ほとんどの細菌など一部の生物は、単細胞である（単一の細胞で構成されている）。ヒトなどの他の生物は、多細胞である。

いくつかの態様において、本発明に従って使用するための細胞は原核細胞であり、細胞エンベロープと、細胞のゲノム（ＤＮＡ）およびリボソームおよび様々な種類の介在物を含む細胞質領域とを含むことができる。いくつかの態様において、細胞は細菌細胞である。本明細書で使用する場合、用語「細菌」は、例えば、原核生物およびシアノバクテリアなど、細菌の全ての変異体を包含する。細菌は、小さく（典型的な直線寸法は約１ミクロン）、非区画化され、環状ＤＮＡおよび７０Ｓのリボソームを有する。細菌という用語はまた、真正細菌と古細菌の細菌亜門を含む。真正細菌は、細胞壁の構造の違いに依存して、グラム陽性とグラム陰性真正細菌にさらに細分することができる。本明細書にさらに含まれるのは、全体的形態のみに基づいて分類されるものである（例えば、球菌、桿菌）。いくつかの態様において、細菌細胞は、グラム陰性細胞であり、いくつかの態様において、細菌細胞はグラム陽性細胞である。

【００７２】

本発明に従って使用することができる細菌細胞の例としては、限定することなく、以下からの細胞が挙げられる：Yersinia spp.、Escherichia spp.、Klebsiella spp.、Bordetella spp.、Neisseria spp.、Aeromonas spp.、Franciesella spp.、Corynebacterium spp.、Citrobacter spp.、Chlamydia spp.、Hemophilus spp.、Brucella spp.、Mycobacteriu

m spp.、Legionella spp.、Rhodococcus spp.、Pseudomonas spp.、Helicobacter spp.、Salmonella spp.、Vibrio spp.、Bacillus spp.、Erysipelothrix spp.、Salmonella spp.、Stremtomyces spp.。いくつかの態様において、細菌細胞は以下からの細胞である：Staphylococcus aureus、Bacillus subtilis、Clostridium butyricum、Brevibacterium lactofermentum、Streptococcus agalactiae、Lactococcus lactis、Leuconostoc lactis、Streptomyces、Actinobacillus actinobycetemcomitans、Bacteroides、cyanobacteria、Escherichia coli、Helobacter pylori、Selnomonas ruminatium、Shigella sonnei、Zymomonas mobilis、Mycoplasma mycoides、Treponema denticola、Bacillus thuringiensis、Staphlococcus lugdunensis、Leuconostoc oenos、Corynebacterium xerosis、Lactobacillus planta rum、Streptococcus faecalis、Bacillus coagulans、Bacillus ceretus、Bacillus popillae、Synechocystis PCC6803株、Bacillus liquefaciens、Pyrococcus abyssi、Selenomonas nominantium、Lactobacillus hilgardii、Streptococcus ferus、Lactobacillus pentosus、Bacteroides fragilis、Staphylococcus epidermidis、Zymomonas mobilis、Streptomyces phaechromogenes、Streptomyces ghanaenis、Halobacterium strain GRB、またはHalobaferax sp. Aa2.2株。

【００７３】

いくつかの態様において、本発明に従って使用するための細胞は、核などのその中で特定の代謝活動が行われている膜結合コンパートメントを含む、真核細胞である。本発明に従って使用するための真核細胞の例としては、限定はされないが、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞（例えばSaccharomyces cerevisiae）および植物細胞を含む。いくつかの態様において、真核細胞は、脊椎動物からのものである。本発明に従って使用するための脊椎動物細胞の例としては、限定はされないが、精子、卵子および胚細胞を含む生殖細胞、ならびに腎臓、肺、脾臓、リンパ系、心臓、胃、腸、膵臓、筋肉、骨、神経、脳および上皮細胞を含む非生殖細胞が挙げられる。胚性幹細胞を含む幹細胞を用いることもできる。

いくつかの態様において、ウイルスまたはファージなどの非細胞系を、本発明に従って使用してもよい。例えば、合成論理／メモリシステムの任意の１または２以上の構成要素を、論理システムの核酸を例えばウイルスゲノムに直接統合することによって、導入することができる。本明細書に記載のように使用するためのウイルスは、以下であってよい：二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス）、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ウイルス（（＋）センスＤＮＡ）（例えば、パルボウイルス）；二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）ウイルス（例えば、レオウイルス）；（＋）ｓｓＲＮＡウイルス（（＋）センスＲＮＡ）（例えばピコルナウイルス、トガウイルス）；（－）ｓｓＲＮＡウイルス（（－）センスＲＮＡ）（例えば、オルソミクソウイルス、ラブドウイルス）；一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）－逆転写酵素ウイルス（ライフサイクルにおけるＤＮＡ中間体を有する（＋）センスＲＮＡ）（例えば、レトロウイルス）；またはｄｓＤＮＡ－逆転写ウイルス（例えば、ヘパドナウイルス）。

【００７４】

ウイルスはまた、植物ウイルスおよびバクテリオファージまたはファージを含むことができる。本発明に従って使用することができるファージファミリーの例としては、限定はされないが、以下を含む：Myoviridae（Ｔ４様ウイルス；Ｐ１様ウイルス；Ｐ２様ウイルス；Ｍｕ様ウイルス；ＳＰＯ１様ウイルス；ｐｈｉＨ様ウイルス）；Siphoviridaeγ様ウイルス（Ｔ１様ウイルス；Ｔ５様ウイルス；ｃ２様ウイルス；Ｌ５様ウイルス；．ｐｓｉ．Ｍ１様ウイルス；ｐｈｉＣ３１様ウイルス；Ｎ１５様ウイルス）；Podoviridae（Ｔ７様ウイルス；ｐｈｉ２９様ウイルス；Ｐ２２様ウイルス；Ｎ４様ウイルス）；Tectiviridae（テクティウイルス）；Corticoviridae（コルチコウイルス）；Lipothrixviridae（アルファリポスリクスウイルス、ベータリポスリクスウイルス、ガンマリポスリクスウイルス、デルタリポスリクスウイルス）；Plasmaviridae（プラズマウイルス）；Rudiviridae（ルディウイルス）；Fuselloviridae（フセロウイルス）；Inoviridae（イノウイルス、プレクトウイルス）；Microviridae（ミクロウイルス、スピロミクロウイルス、ブデロミクロウイルス、クラミジアミクロウイルス）；Leviviridae（レビウイルス、アロレビウ

イルス）およびCystoviridae（シストウイルス）。かかるファージは、天然に存在するか、または操作されたファージであってよい。

いくつかの態様において、細胞または細胞系は、「天然の細胞」である（例えば、天然に見出され、人工または合成ではない）。いくつかの態様において、細胞または細胞系は、人工細胞または合成細胞である。本明細書で使用する場合、「人工細胞」または「合成細胞」は、天然の細胞が機能することができる方法で機能することができる（例えば、タンパク質を転写および翻訳し、ＡＴＰを生成する）、人工的な部品から形成された、最小限の細胞である。

【００７５】

本発明による宿主細胞は、合成論理システム（例えば、論理ゲート）の１または２以上の構成要素での形質転換またはトランスフェクションの際に、合成論理／メモリシステム構成要素の活性化および発現を支持することができる、任意の宿主細胞を含む。

いくつかの態様において、本発明の合成論理／メモリシステムの１または２以上の構成要素は、ベクターまたはプラスミドを用いて、細胞系または非細胞系に導入することができる。本明細書で使用する場合、「ベクター」は「プラスミド」と互換的に使用されて、それが連結している別の核酸を輸送できるところの核酸分子を指す。それらが作動可能に連結された遺伝子および／または核酸配列の発現を指向し得るベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。一般に本明細書に記載の発現ベクターは、多くの場合プラスミドの形態であり、これは、染色体に結合していない円形の二本鎖ＤＮＡループである。発現ベクターは、ＤＮＡの安定なまたは一過性発現のためのベクターであってよい。ベクターは、自己複製する染色体外のベクターまたは宿主ゲノムに組み込まれるベクターのいずれでもよい。他の発現ベクターも本発明に従って使用することができ、これには、限定するものではないが、エピソーム、バクテリオファージおよびウイルスベクターを含み、かかるベクターは、宿主のゲノムに組み込まれるか、使用される特定の細胞系中で自律的に複製することができる。同等の機能を果たす、当業者に知られている発現ベクターの他の形態を使用してもよい。

【００７６】

本発明の核酸配列（例えば、論理ゲートをコードするもの）を含むベクターは、ＤＮＡおよびＲＮＡを細胞内に導入するための当技術分野で周知の技術により、ポリヌクレオチドとして細胞内に「導入する」ことができる。本明細書で使用する場合、「トランスフェクション」は、遺伝物質（例えば、核酸配列を含むベクター）の、細胞、組織または生体への導入を指す。細胞のトランスフェクションは、安定的または一過性であってよい。宿主細胞は、核酸が細胞内に導入されるが、宿主細胞のゲノムに組み込まれない場合に、一過性にトランスフェクトされると考えられる。一過性トランスフェクションは、例えば、核酸によってコードされるポリペプチドの存在を検出する酵素結合免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）により検出することができ、または核酸によってコードされるタンパク質の活性を検出することによって検出することができる。対照的に、宿主細胞が安定的にトランスフェクトされたと考えられるのは、核酸が細胞内に導入されて、宿主細胞のゲノムに組み込まれる場合である。安定的にトランスフェクトされた細胞は、導入された核酸を、それらの子孫に渡す（減数分裂を介した安定した遺伝力）。細胞の安定なトランスフェクションは、細胞のゲノムＤＮＡの、１または２以上の導入遺伝子に結合することができる核酸配列とのサザンブロットハイブリダイゼーションによって、または、導入遺伝子配列を増幅するための細胞のゲノムＤＮＡのポリメラーゼ連鎖反応によって、検出することができる。

【００７７】

いくつかの態様において、合成ＲＮＡプロセッシングプラットフォームを用いて、ｍＲＮＡを処理して下流遺伝子から５’非翻訳領域（ＵＴＲ）を分離することができる。たとえば、自己切断リボザイムをコードする配列（例えば、RiboJ［６８］；AGCTGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAA［配列番号１６］）を出力核酸の上流（例えば、直接上流）に挿入して、遺伝子の発現を向上させることができる。RiboJは、例えば、自己開裂して上流ＲＲＳの下流遺伝子の翻訳へ

の影響を低減する。いくつかの態様において、細菌がクラスタ化され定期的に間隔をとった短いパリンドローム反復（CRISPR）経路を用いて、ｍＲＮＡを処理して下流遺伝子から５’ＵＴＲを分離することができる［７０］。いくつかの態様において、上流の「使い捨て」オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）と下流ＯＲＦを有する結合翻訳系を用いて、下流のより信頼性の高いプログラム可能な翻訳を有するｍＲＮＡを、生成することができる［７１］。他の合成ＲＮＡ処理プラットフォームもまた、本明細書中で企図されている。

【００７８】

合成論理／メモリシステムの使用

本発明の、リコンビナーゼに基づく合成論理／メモリシステムは、原核細胞、真核細胞および合成細胞などの細胞系において、または試験管、ウイルスおよびファージを含む非細胞系において、複雑な挙動の表現型を操作するために、特に有用である。本明細書に記載の論理／メモリシステムは、核酸に基づく操作方法の力を、治療的、診断的および基礎科学的用途のための、細胞のまたは生物学的な状態機械、挙動および経路のプログラミングを行うための、計算機およびシステム生物学アプローチと組み合わせる。本明細書で使用する場合、「状態機械」とは、所定の時間における何かの状況（status）（または状態）を保管（記憶）し、入力（単数または複数）によって状況を変化させるよう、および／または所与の変化に対して行動（単数または複数）または出力（単数または複数）を引き起こすように動作することができる、任意のツールを指す。典型的には、状態機械は以下を含む：入力事象のセット、出力事象のセット、状態のセット、状態と入力（単数または複数）を出力（単数または複数）にマッピングする関数、状態と入力を新しい状態にマッピングする関数（状態遷移関数と呼ばれる）、および初期状態の記述。

【００７９】

本発明の合成論理／メモリシステムは、様々な用途ならびに、バイオレメディエーション、バイオセンシングおよび生物医学的治療を含む多くの異なる種類の方法において使用することができる。いくつかの態様において、論理／メモリシステムは、遺伝子発現または合成分化カスケードのための多重化細胞スイッチを構築するために使用することができる。細胞シグナルは、シグナルをリコンビナーゼ発現に連結することにより、論理／メモリシステムへの入力として統合することができる。本発明の論理／メモリシステムを有する多細胞系はまた、分散計算または合成細胞コンソーシアムを実現することもできる［２３～２６］。

【００８０】

いくつかの態様において、本発明の合成論理／メモリシステムを用いて、デジタル表現をアナログ出力に翻訳する「デジタル－アナログ変換器」を構築することができる。かかるシステムを用いて、システムの内部状態を確実に設定することができる。例えば、化学誘導物質の量を変化させて転写活性を微調整する代わりに、遺伝子スイッチ（異なるリコンビナーゼおよび論理ゲート）のバンクで構成されて各スイッチが異なる誘導物質に敏感なデジタル－アナログ変換器は、より良好な制御を提供する。それぞれの活性化スイッチを介して、変動する強度（例えば、$P_{出力、3} > P_{出力、2} > P_{出力、1}$）のプロモーターからの転写を有効にすることで、誘導剤のデジタル的組み合わせを用いて、転写活性の規定されたレベルをプログラムすることができる。かかる回路は、異なる経路の信頼性発現が、操作された細胞における異なる動作モードをプログラムするために必要とされる、バイオテクノロジー用途において使用することができる。さらに、デジタル－アナログ変換器は、合成回路をプロービングするための多重化方法を提供するのに有用である。例えば、各アナログレベルは明確なデジタル状態に関連付けられているため、単一のアナログ出力によって、合成遺伝子ネットワークの内部デジタル状態を推測することが可能である。

さらに、いくつかの態様において、本発明の合成論理／メモリシステムは、飲料水中のヒ素、および／または一定範囲の毒素および／または重金属を検出するために使用することができる。システムは、毒素および重金属を消化し中和することができる、遺伝子操作

された細菌に結合することができる。これは、例えば、特定の毒素または重金属を検知する細菌によって実現され、センサーはリコンビナーゼ発現を制御する誘導性プロモーターのための入力として直接連結され、次に、遺伝子、プロモーターまたはターミネーターをフリップする（例えば活性化または脱活性化する）ことによって、論理／メモリシステムを活性化させる。その結果、毒素および重金属の消化および中和を制御する経路がオンとなる。

【００８１】

本発明の合成論理／メモリシステムの方法および使用は、in vivo、ex vivo、またはin vitro系を含むことができる。用語「in vivo」は、多細胞動物などの生体の中または内側で起こるアッセイまたはプロセスを指す。いくつかの態様において、方法または使用は、細菌などの単細胞生物を使用する場合、in vivoで起こると言うことができる。用語「ex vivo」は、生細胞および、多細胞動物または植物体の外にある無傷の膜（例えば、外植片、初代細胞および細胞株を含む培養細胞、形質転換された細胞株、および、特に血液細胞を含む、抽出した組織または細胞）を用いて実施される、方法および使用を指す。用語「in vitro」は、細胞抽出物などの、無傷の膜を有する細胞の存在を必要としないアッセイおよび方法を意味し、操作された遺伝子カウンターを、非細胞系中に、例えば細胞または細胞抽出物等の細胞系を含まない培地などに導入することを、意味してもよい。

【実施例】

【００８２】

リコンビナーゼに基づく論理／メモリシステム

attBとattPとして知られている非同一の認識部位を標的とするセリンリコンビナーゼBxb1およびphiC31を用いて、認識部位の周囲の対の向きに基づき、ＤＮＡを不可逆的に反転または切除した[１１]。入力の不在のもとで低い漏れを確実にするために、Bxb1［１２］およびphiC31［１３］を、それぞれＮ－アシルホモセリンラクトン（ＡＨＬ）およびアンヒドロテトラサイクリン（ａＴｃ）誘導性リボレギュレーター［１４］の制御下でクローニングした。全ての細胞は、これらのリコンビナーゼ発現構築物の両方を含んでいた。ここで、ＡＨＬを介したBxb1発現は入力Ａとして、およびａＴｃを介したphiC31発現は入力Ｂと呼ぶ。本発明の論理／メモリシステムの出力は、緑色蛍光タンパク質（gfp）をレポーター遺伝子として用いてアッセイした。本明細書に示したデータは、Bxb1およびphiC31が、互いに直交して動作することを示す（図２の「Ａ」および「Ｂ」ゲートを参照）。

【００８３】

リコンビナーゼが触媒する、カスケード接続プロモーターの反転（リコンビナーゼプロモーター論理）は、プロモーターの最初の向きに応じて、ＯＲ論理およびＮＡＮＤ論理を実現することができる（図２）。両プロモーターが下流出力遺伝子に対して反転している場合、入力ＡまたはＢによるどちらかのプロモーターのフリッピング（すなわち反転）は、高いＧＦＰ出力をもたらす（ＯＵＴ＝Ａ ＯＲ Ｂ）。両プロモーターが下流遺伝子出力に対して直立している（反転していない）場合、入力ＡおよびＢによる両プロモーターの反転が、低出力を生成するために必要とされる（ＯＵＴ＝Ａ ＮＡＮＤ Ｂ）。

リコンビナーゼが触媒する、カスケード接続一方向性ターミネーターの反転は（リコンビナーゼ－ターミネーター論理）、ターミネーターの最初の向きに応じて、ＡＮＤ論理およびＮＯＲ論理を実現することができる（図１および図２）。２つのターミネーターが直立して、プロモーターと出力遺伝子の間に配置されている場合、入力ＡおよびＢによる両プロモーターの反転は、高出力をもたらす（ＯＵＴ＝Ａ ＡＮＤ Ｂ）。２つの一方向性ターミネーターが最初に反転している場合、入力ＡおよびＢによるどちらかのターミネーターの反転は、低出力をもたらす（ＯＵＴ＝Ａ ＮＯＲ Ｂ）。

【００８４】

ＮＯＲゲートおよびＮＡＮＤゲートは汎用論理演算であり、電気的システムでしばしば行われるように、より複雑な機能を実現するために一緒にアセンブルすることができる［１５～１７］。しかし生物学的システムは、合成回路設計に利用可能なはるかに少ない部品数の、リソースが制約された環境である。したがっていくつかの態様において、複雑な

論理関数の直接的かつ効率的なコード化が、複数の汎用ゲートをカスケード接続する必要なしに実現される。

リコンビナーゼ反転可能プロモーター、ターミネーター、および出力核酸配列の異なる組み合わせを構築することにより、全ての２入力ブール論理関数が、マルチ論理ゲートのカスケードを必要とすることなく、個々の細胞において作製された（図１および図２）。これは、再利用可能なリコンビナーゼ反転可能構成要素を使用した、モジュール式ワンステップギブソン・アセンブリ戦略を用いて実施された［１８］。簡単なプログラミング言語が、指定された設計によって実現される論理関数を、［プロモーター（単数または複数）］－［ターミネーター（単数または複数）］－［出力］の構造として定義する（図２）。具体的には、出力核酸発現が生じる可能性があるのは、（少なくとも1つの上流プロモーターが直立である）ＡＮＤ（どのターミネーターも直立ではない）ＡＮＤ（出力核酸は直立である）場合のみである。

【００８５】

これらの単純なプログラミングルールを使用して、与えられた論理関数を、リコンビナーゼ反転可能モジュールの異なる組み合わせを用いて実現することができ、こうして設計に柔軟性を与える（図２および図３）。例えば、Ｂ ＮＩＭＰＬＹ ＡはＢ ＡＮＤ ＮＯＴ Ａに等しい；この論理関数は、（入力Ｂの発現により）phiC31によってフリップされた反転プロモーターを、（入力Ａの発現により）Bxb1によってフリップされた下流反転ターミネーターと、および下流の直立gfp出力遺伝子とカスケード接続することにより、構築することができる(図２)。この構成において、遺伝子発現は、ＢがＴＲＵＥでありＡがＦＡＬＳＥである場合にのみ生じる。

さらに、複雑なＸＯＲゲートおよびＸＮＯＲゲートは、両方のリコンビナーゼのリコンビナーゼ認識部位の間に構成要素を配置することにより、他の論理ゲートの単純さを有して実現することができる（図２および図３）。図２のＸＯＲゲートにおいて、プロモーターは、最初反転されている。ＡＨＬまたはａＴｃのいずれかによるプロモーターの任意の１つの反転は、ＧＦＰの発現をもたらし、一方で、ＡＨＬおよびａＴｃの不在によるプロモーターの反転なし、またはＡＨＬおよびａＴｃ両方の存在によるプロモーターの二重反転は、ＧＦＰ発現の不在をもたらす（図２）。図３のＸＯＲゲートにおいて、gfp遺伝子は最初に反転されており、単一の入力によるこの遺伝子の単一の反転は、ＧＦＰ発現をもたらす。ＸＮＯＲゲートにおいて、gfp遺伝子は、最初に直立している(図２)。したがって、単一の入力の存在はgfp遺伝子を反転させ、それ以外の場合に存在するであろうＧＦＰ発現を消失させる(図２)。

【００８６】

この計算パラダイムの重要な特徴は、これらの論理ゲートが、入力が取り消された後にも、安定した出力メモリを維持することである。これは、ＡＮＤゲートを両方の入力でそのオン状態に誘導し、次に入力なしで９日間（＞９０世代）、これらの細胞を繰り返しサブ希釈（sub-diluting）して増殖させることにより、実証された（図４Ｂ）。この回路は、誘導後の全期間を通じて高出力を維持した。この特性は、複雑な、状態依存性の合成回路の作製を可能にする。さらに、転写または転写後の論理とは異なり、計算の状態はＰＣＲを用いて、細胞死の後にも検出することができる（図４Ｂ）。この特徴を用いて、その状態をハイスループットシークエンシング技術を使用して多重化方式で調べることが可能な、細胞バイオセンサを作製することができる。

【００８７】

合成生物学の主要な目標の１つは、合成遺伝子回路を使用して、プログラム可能な機能を備えた上位ネットワークを開発することである［４３］。この目標を達成する能力を実証するために、デジタル誘導物質入力を安定なアナログ遺伝子発現出力に変換する、デジタル－アナログ変換器を構築した［４４］。これらのデジタル－アナログ変換器回路は、２つのデジタル誘導物質入力（ＡＨＬとａＴｃ）を受け入れて、異なる強度の構成的プロモーターからの遺伝子発現のリコンビナーゼ反転可能トグルに基づき、４つの安定したアナログ遺伝子発現出力レベルを生成する（図２６Ａ～２６Ｃ）。３つの構成的プロモータ

ー（ｐｒｏＡ、ｐｒｏＣ、およびｐｒｏＤ[31]）を用いて、異なるデジタル設定可能（プログラム可能）レベルを有する３つの異なるデジタル－アナログ変換器を構築した。下流Bxb1およびphiC31リコンビナーゼ認識部位を有する変異型プロモーターの相対的強度は、ＧＦＰ蛍光をフローサイトメトリーで測定することにより決定した（図２７）。これらの結果は、phiC31 attB部位が、Bxb1 attB部位または介在リコンビナーゼ認識部位なしの場合と比較して、全てのプロモーターからのＧＦＰ発現を減少させたことを示した。

【００８８】

各デジタル－アナログ回路は、これらの変異型構成的プロモーターの対を含み、その各々は、誘導性リコンビナーゼ媒介性の反転の後にのみ、ＧＦＰの発現を駆動する。両方の入力に暴露された場合の全ＧＦＰ出力は、ＡＨＬのみが存在する場合のＧＦＰレベル＋ａＴｃのみが存在する場合のＧＦＰレベルにほぼ等しい（図２６Ａ～２６Ｃ）。各リコンビナーゼ反転可能gfp発現カセットの個々のアナログ出力レベルが、互いに２倍に変化するように設計された場合には、デジタル－アナログ回路の出力は、単純なバイナリコードに基づいて入力により決定した。例えば、図２６Ｃにおいて、デジタルＡＨＬ入力は、究極のアナログ遺伝子発現出力を生成するためにスケーリングされたバイナリ整数における、最下位ビットとして表すことができ、デジタルａＴｃ入力は、最上位ビットとして表すことができる。

【００８９】

バイオテクノロジープロセスにおいて、構成的プロモーターは安定した遺伝子発現のために有用であるが、遺伝子の発現レベルを動的に調整する、または規定された時点において遺伝子発現を誘導することは、一般にできない［４５］。これとは対照的に、誘導性プロモーターは調節可能な遺伝子発現を提供するが、誘導物質に依存し、これは高価となり得るか、またはより高い容量にスケーリングするのは困難である［４５］。本発明によるデジタル－アナログ変換器は、構成的プロモーターと誘導性プロモーターの間の有利な妥協点を提供し、ｎ個の入力誘導物質の適用による2^nの構成的出力発現レベルの、スケーラブルなプログラミングを可能にするように拡張することができる。これらの回路を含む細胞は、定義された構成的発現レベルにそれらをロックするために、一過性にのみ誘導されることが必要であり、こうして、誘導物質の拡張性に関連する問題を軽減する。本発明のデジタル－アナログ回路はまた、単一のアナログ出力を有するデジタルイベントの多重化報告のためにも有用である。例えば図２６Ｃに示すように、別個のアナログ発現レベルを、単純なバイナリコードによって、それらのデジタル入力の組み合わせに一意的にマッピングすることが可能である。

要約すると、本発明は、単一の細胞内に、統合された論理／メモリのための効率的なプラットフォームを提供する。このモジュール式ＤＮＡアセンブリ戦略は、論理関数の簡単なプラグアンドプレイのコード化と、ＤＮＡの情報を「書き込む」リコンビナーゼの能力から生じる付随メモリを可能にする。一方向性のリコンビナーゼが使用されるため、本発明の論理ゲートは、時間の経過とともにその入力のメモリを維持し、所定の時間におけるそれらの入力に条件付けられない。この特性は、順序論理と安定した細胞状態を実現する、生物学的状態機械の構築を可能にする。

【００９０】

例２．Saccharomyces cerevisiaeにおける統合論理／メモリ

リコンビナーゼを、例えば、ａＴｃ、ＩＰＴＧ、銅およびガラクトースにより制御可能なものを含む、S. cerevisiaeにおける誘導性プロモーターの制御下に置く。使用するリコンビナーゼは、phiC31、Bxb1、TP901-1、A118およびU15353を含む。リコンビナーゼ活性を、プロモーター（例えば、pCYC1、pADH1、pPGK1）および反転リコンビナーゼ認識部位の対（ＲＲＳ）の間に配置された酵母強化gfp（ｙＥＧＦＰ）などの下流反転遺伝子を含有するレポーター構築物を用いて、試験する（図３２、左）。同族リコンビナーゼによるＲＲＳの認識による遺伝子反転の際に、ｙＥＧＦＰが発現される。リコンビナーゼ効率をフローサイトメトリーを用いて経時的にモニターし、測定をＰＣＲ（例えば、遺伝子が最初に反転される場合にのみ増幅する特定のプライマー、および遺伝子がフリップされた

後にのみ増幅するプライマーを用いて）およびＤＮＡ配列決定で確認する。リコンビナーゼ反転効率は、９０％よりも高くなり得る［４６］。リコンビナーゼの互いのＲＲＳに対する直交性は、全てのリコンビナーゼを全てのレポーター構築物を用いてクロスすることにより特徴付けられる（図３２、右）。これらのリコンビナーゼは、それらのＲＲＳ間の配列の違いを考えると、一般に高度に特異的である。反転に加えて、リコンビナーゼの切除効率と直交性を試験する。ターミネーターを、構成的プロモーターおよび下流yegfp遺伝子との間に配置する（図３３）。このターミネーターは同じ方向に向いている２つのＲＲＳの間に配置され、したがって切除をもたらす。酵母ターミネーターの例としては、限定はされないが、CYC1およびADH1ターミネーターを含む。リコンビナーゼの反転／切除活性および直交性を検証した後、統合論理／メモリ回路を構成する。ＡＮＤ、ＯＲ、ＮＡＮＤ、ＮＯＲ、ＸＯＲ、およびＸＮＯＲなどの論理ゲートを、図２に示すものと同様の戦略を使用して構築する。これは、リコンビナーゼを、反転可能または切除可能なプロモーター、ターミネーター、および遺伝子の異なる組み合わせを含む、独立した誘導性の制御および標的化回路下に配置することにより、達成される。これらの回路の動作は、フローサイトメトリーを用いて、誘導性因子入力の異なる組み合わせによる蛍光出力に基づき、特徴付けられる。

【００９１】

リコンビナーゼ、プロモーターおよびレポーターを含む合成カセットを、異種遺伝子発現のための適切な標的として同定されているHIS3、TRP1、LEU2、URA3、およびHOを含むゲノム遺伝子座に統合する［４７，４８］。合成構成要素の統合がチャレンジであるいくつかの例においては、絶縁体エレメントが構築物に導入されるか［４９］、または酵母人工染色体（ＹＡＣ）が使用される。

S．cerevisiaeにおいて効率的ではないリコンビナーゼのために（例えば、温度またはその他の要因により）、遺伝子はコドン最適化され、指向進化を実施して、高い活性を有するリコンビナーゼの変異体を同定する。リコンビナーゼの発現も調整することができ、これはいくつかの例において、リコンビナーゼに分解タグを追加することにより［５０］、合成上流オープンリーディングフレームを調整することにより［５１］、５’ＵＴＲ配列を改変することにより［５２］、またはプロモーターを変異誘発して、漏れや乏しい分解からの不要な活性の問題を最小化することによる。

【００９２】

例３．生物学的状態機械の自動設計のための計算アルゴリズム

統合論理／メモリのためのリコンビナーゼに基づく回路は、単純な設計ルールによって記述することができる。例えば、ＲＲＳが互いに重ならず、遺伝子構築物が単純な［プロモーター（単数または複数）］－［ターミネーター（単数または複数）］－［出力］構造を有する場合（図１）、遺伝子発現が起こるのは、（少なくとも１つの上流プロモーターが直立であり）ＡＮＤ（ターミネーターが全て直立しておらず）ＡＮＤ（出力遺伝子が直立である）場合のみである。ＲＲＳが重複するものなどの、より複雑な遺伝子構築物では、潜在的な順列の複雑さが非常に急速に増加するが、それでも簡単なルールを介して別個の状態遷移に分解することができ、例えば、リコンビナーゼ発現は、一対の反転ＲＲＳ間でのＤＮＡの反転、および一対の同方向に配向するＲＲＳ間でのＤＮＡの切除をもたらす。

設計のボトルネックに対処するために、目的の状態図（例えば、ＨＳＣ分化ネットワーク、図３７）を、合成部を有する生物学的な実装（図３４）へと直接変換可能な計算アルゴリズムが作成されて、例えばMatlabに実装されている。基本的なソフトウェア構造を、以下に説明する。

【００９３】

このソフトウェアプログラムは、所与の数の遺伝子が事象の特定のパターンまたは順序において活性である状態依存性システムを開発するために研究者が必要とする入力を最小化する、状態図から回路への設計プロセスを提供する。アルゴリズムは、構築物を、出力が各ノードにおける遺伝子発現によって定義されるところの分化ダイアグラムと一致する

ように作製することによって、検証される。これを行うために、ソフトウェアは、セリンリコンビナーゼ（例えば、単純化のために一方向性リコンビナーゼに着目）およびＲＲＳ、プロモーター、ターミネーター、および遺伝子モジュールなどの部品の特定のセットを適用する。分化ネットワーク内のノードは、各状態において所望の遺伝子発現出力を得るために、これらの部品の特定の構成を有する状態である。これらの状態は、リコンビナーゼ論理を介して、単一の反転または切除事象が状態間の遷移を引き起こすように、連結されている。

【００９４】

図３４は、本発明のアルゴリズムの一般的概要の非限定的な例を示す。ユーザーは、複雑な条件付きの様式で動作する、目的の状態図を設計する（図３４Ａ）。示された分化ネットワークの例では、「１」の入力は、常に、出力の現在のセットに対する、青色遺伝子の追加の発現をもたらし、一方「２」の入力は、緑色遺伝子の発現を付加する。最後に、「３」が最初の入力の場合、元の赤の遺伝子が保存される。そうでなければ、状態ＢおよびＣ（図３４Ａ）に見られるように、元の赤の遺伝子のスイッチがオフにされる。この動作は、ユーザーが、状態、それらに対応する出力、およびそれらを連結する遷移を描く方法から、直接生じる。多数の他の状態機械および設計アーキテクチャが、本明細書において企図されている。複数の遺伝子が同時に活性になっているところのノードを定義することができ（状態Ｅ－Ｈ）、または２つのノードが、同じ出力の異なる状態（状態ＡとＤ）を有するか、またはノードの全ての発現がオフになっているところのノードを定義できる。提供される例が利用するネットワークでは、入力（例えば、入力１、２および３の全ての可能な順列）の可能性ある全てのセットは描画されていない。「１」または「２」の初期入力は、さらなる入力がシステムに生産的に送達されることを防ぐ。ユーザーはまた、全ての可能な遷移が新たな出力を生成はしないツリーも、定義することができる（ただし技術的には、新しいＤＮＡ状態を生成することができる）。

【００９５】

ユーザーが一旦、所望の状態機械図をプロットすると、次のステップは、得られた図を文法に変換することである（図３４Ｂ）。文法の記述は、ネットワーク内の全ての遷移をリストすることであり、ここで各エントリは、その遷移における入力、遷移が由来する状態、それが終了した状態、およびこれら両方の状態の出力を含む。

文法を適用して、プログラムは、提供されたネットワークの動作を達成するために必要な部品の最小集合を評価する（図３４Ｃ）。プログラムに初期化される遺伝子モジュールの数は、ネットワーク内の全出力の固有のセットに応じて選択され、一方で調節エレメントの数は、ネットワーク内の全ての出力で同時に発現される遺伝子の最大数によって決定される。並行して、プログラムは、ユーザーにより指定された固有の入力数に基づいて、必要とされるリコンビナーゼの数を決定する。

【００９６】

選択された部品により、プログラムは、遺伝子発現の構成要素とリコンビナーゼ部位の全ての関連する順列を、別々に計算する（図３４Ｄ）。これは、アルゴリズムの計算負荷を低減し、また、遺伝子調節および組換えエレメントの基礎となる論理の、分離された評価（uncoupled assesment）が可能となる。遺伝子調節部品およびリコンビナーゼ部位の両方について、プログラムは、組み合わせを計算する際に各構成要素の２つの可能な向きを、構成要素が他と相対的にその上に存在するところのＤＮＡ鎖に依存して説明する。計算の必要性をさらに減らすために、リコンビナーゼの組み合わせの決定は、少なくとも第一近似として、リコンビナーゼ部位が交換可能であることを仮定することにより、行うことができる。

【００９７】

プログラムは、生成された各組み合わせの基本論理を査定する。遺伝子発現を解析する場合、プログラムは、各構築物中の全ての遺伝子モジュールの位置を査定し、遺伝子調節エレメントの相対的な向きおよび位置に基づいて、それが活性であるかどうかを評価する。同じ遺伝子出力を有する構築物は、その後、一緒にグループ化される（図３４Ｅ）。こ

れをさらに強化するために、スコアリングアプローチを実装でき、これは、各構築物を生物学的実現可能性について分析する。遺伝子調節構築物が、遺伝子出力に対応するビン内に配置されると、プログラムは、それぞれの遷移を順番に見ることにより、全体の分化図を横断して、その遷移の開始および終了状態に対する出力に対応するビン内の候補が、単一の組換え事象によって分離されるかどうかを計算する。候補が各遷移について処理されるにしたがって、その遷移の要件を満たさないものは廃棄され、ネットワーク全体に適合する構築物が最終的に出現することを可能にする。

ＲＲＳの場合には、論理演算は、ＲＲＳの組み合わせの現在の状態Ｑｎ、および、可能なユニークな入力Ｉの全ての組み合わせの全セットの後に得られる状態Ｑｎ＋１を追跡するテーブルの作成が伴う（図３４Ｆ）。後者は、ネストされた部位のユニークな条件付き性質を説明し、例えば、１→２の入力は、ＲＲＳが互いの内部にネストされている場合、同じ入力の逆の順序（例えば２→１）とは異なるＲＲＳの配向をもたらし得る。したがって、２つのみのリコンビナーゼ入力を有するシステムについて、可能な入力のフルセットは、Ｉ＝［１，２，１→２，２→１］となる。

【００９８】

最後に、適切な遺伝子発現プロファイルを生じさせる構築物の集合と、全ての入力に適合するリコンビナーゼ論理についての情報を組み合わせて、おそらくは異なるアーキテクチャを有して、所望の状態図と同じ動作を示す回路の完全なセットを生成する（図３４Ｈ）。分化ネットワークにおける全ての遷移を満たす生産候補の提案がない場合、プログラムは、最初の部分の選択段階にもどり、さらなる遺伝子調節部品を順番に追加して、成功する構築物設計が発見される可能性を高める。

最終的に、このアルゴリズムは、ＲＲＳの異なる順列および調節部品を含み、与えられた所望の状態図を満たすであろう、リコンビナーゼに基づく回路のリストを生成する。このアルゴリズムは、逆のプロセスを経て検証することができる。すなわち、得られた各リコンビナーゼに基づく回路に対して、全ての可能な状態を異なる識別（identity）および入力のタイミングに基づいて遷移させ、対応する状態図を描いてアルゴリズムの精度を確認する。

【００９９】

各追加のリコンビナーゼおよび設計用に利用可能なＲＲＳのセットと共に予想される、回路の複雑さの急激な増加のために、アルゴリズムの計算時間は急速に拡張し得る。処理時間を最小化するため、アルゴリズムを並列化して計算クラスタ上で実行し、コードを、別の言語（例えばＣ言語）を使用して最適化することができる。さらに、より大きい状態図は、多くの場合小さい状態図の組み合わせに分解することができるので、より小さい状態図の結果をメモリに保存し、結果を将来の計算に使用して、不必要な再計算を最小化することができる。

コアアルゴリズムを改善して、そのフレキシビリティ、パワーおよび効率を高めることができる。他のリコンビナーゼ反応（例えば、統合または双方向反転）を加えることができ、またはさらなる調節エレメントの種類を定義することができる。ツールを、生物学的負荷を制限しつつ計算効率を最大化する、ランクソート設計に精緻化することができる。全ての状態図は、通常、多くの可能性ある回路実装を有するであろうため、様々な実装を、期待される性能に基づいて採点することができる。例えば、非常に短いＤＮＡ配列は、リコンビナーゼ活性に必要なＤＮＡループ上のＤＮＡの剛性の影響のために、より長い配列よりも非効率的に反転される［５４］。また、別のリコンビナーゼは異なる効率を示す可能性があり、これは、例えば例２からのデータによる採点基準に組み込むことができる。

【０１００】

例４．生細胞における合成「幹細胞」および分化ネットワーク

多能性幹細胞状態は、高等生物の生物学の中心であるが、単細胞Saccharomyces cerevisiae（S. cerevisiae）には存在しない。幹細胞および分化ネットワークのモデルを構築するために、幹細胞の挙動を有するS. cerevisiaeにおける合成回路を、ギブソンおよび

ゴールデンゲートＤＮＡアセンブリ戦略を使用して設計し、これらの回路を酵母人工染色体（ＹＡＣ）にゲノム的に組み込むか、またはこれに配置した（図３５）。これらの回路は、PSCW11などの娘特異的プロモーターを利用して［５５，５６］、幹細胞の特徴的な非対称細胞分裂を可能にする。リコンビナーゼは、娘細胞においてのみ非対称的に発現されることができるように、娘特異的プロモーターの制御下で発現される。これらのリコンビナーゼは、酵母幹細胞状態から下流状態への遷移を誘発する（下記参照）。娘特異的回路は、「幹細胞」実験を外部的に開始して制御することを誘導するように設計されている。これは、娘特異的プロモーターの出力を、誘導性合成転写因子（ｓＴＦ）として設計することにより達成され（例えば、ＴｅｔＲに基づく、またはＬａｃＩに基づくｓＴＦ）、該因子は、下流のリコンビナーゼの発現を制御し、娘特異的プロモーターを改変して誘導性リプレッサー（例えば、ＴｅｔＲまたはＬａｃＩ）に対する結合部位を含有させ、および／または誘導性リコンビナーゼを使用する（例えば、エストラジオール誘導性Ｃｒｅ）。

【０１０１】

これらの娘特異的回路のダイナミックレンジと時間経過は、出力としての蛍光タンパク質および、顕微鏡法を用いた細胞蛍光プロファイルのモニタリングにより特徴付けられる。画像処理ソフトウェアを用いて［５７］、娘細胞への蛍光閉じ込めを確認し、その濃度および外部誘導物質に対する時間依存性を測定する。

合成分化ネットワークの設計。上述した非対称回路は、外部誘導物質を添加すると、酵母幹細胞の娘においてのみ、分化カスケードを活性化する。合成ネットワークは、これらの「前駆」細胞を特定の分化経路の下に導くように操作されている。２つのプルーフ・オブ・コンセプト分化ネットワークを、モデル系として使用する：（１）２対４マルチプレクサ回路、ここで、２つの外部入力のタイミングおよび識別は、４つの異なる蛍光タンパク質出力をもたらす（図３６）、および（２）ＨＳＣの分化経路を模倣するネットワーク（図３７）。

【０１０２】

これらのネットワークへの入力は、リコンビナーゼ発現を制御する外部の誘導物質である。確率的切り替えは、中間リコンビナーゼレベルを発現することによって達成されるか、または高レベルのリコンビナーゼを発現して、完成への切り替えを誘導することにより、達成される。リコンビナーゼ発現を微調整するには、ワイドダイナミックレンジ（ＷＤＲ）正のフィードバック（ＰＦ）シャントモチーフ［５８］を、S. cerevisiaeに実装する。ｔｅｔＯ結合部位を有するプロモーターは、TetONに基づく系を発現するように設計される（ここでａＴｃは、TetR-VP16のプロモーターへの結合を誘導する）。このＰＦループを、これが低コピー数で存在するように、ＹＡＣ上に組み込むかまたは配置する。シャントのためには、高コピー２ミクロンプラスミド上に蛍光タンパク質を発現するｔｅｔＯ結合部位を有するプロモーターを操作する。同様の戦略を、ＬａｃＩ調節遺伝子の、イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）に基づく制御のために、使用する。ＷＤＲ回路の動作はフローサイトメトリーを使用して検証され、その後蛍光遺伝子をリコンビナーゼで置換する。

【０１０３】

これらの分化ネットワークの出力としては、蛍光、比色、ルシフェラーゼ遺伝子および薬剤耐性遺伝子などの、異なるレポーター遺伝子が挙げられる。レポーターは、各状態における細胞集団の割合の、便利な測定を可能にする。例えば、フローサイトメトリーを用いて、３つより多くの同時蛍光レポーターを有する単一回路の多重化されたイメージングを実行することがチャレンジであり得る例において、上記で提案されているのとは別のレポーターを使用するか、または、同一回路の複数のバージョンを、２もしくは３のレポーターを異なる出力遺伝子位置に配置して、構築する。出力はまた、内因性または合成経路を調節する、ｓＴＦであることもできる［５９～６２］。ｓＴＦは、ジンクフィンガー（ＺＦ）、転写アクチベーター様エフェクター（ＴＡＬＥ）、およびクラスタ化され定期的に間隔をとった短いパリンドローム反復（CRISPR）転写因子の枠組から離れて構築され、各状態において、調節可能に制御された所望の経路を可能とする。例えば、合成転写因子

（ｓＴＦ）を用いて、各状態（例えば、偽菌糸成長、交配型、凝集）における内因性の経路を別個に調節することができる。

【０１０４】

上述のアルゴリズムからのリコンビナーゼ回路の、多くの異なる実装を用いることができ、不十分な性能の例において複数の潜在的な選択肢を可能にする。手動で設計された回路を使用することもできる。いくつかの設計は、反転または切除について同じリコンビナーゼによって認識される複数のＲＲＳ対をコードすることができる。望ましくないＲＲＳ間のクロストークを低減するために、同一の配列を共有するが、その中央ジヌクレオチド残基が変異したＲＲＳを、設計することができる。同一の中央ジヌクレオチドを含むＲＲＳ対は、互いに優先的に反応することが示されている［６４～６６］。さらに、ＰＦ－シャントＷＤＲ対数回路を介してリコンビナーゼを発現することの代替としては、線形化転写回路を使用することができる［６７］。これらの負のフィードバック回路は、外部の誘導物質による出力遺伝子の線形制御を可能にする。大腸菌でのＷＤＲ対数回路であって、正のフィードバック（ＰＦ）成分をＬＣＰ上に必要とせず、シャント成分を別のＨＣＰ上に必要としないものも、開発されている（Daniel, Rubens et al.、準備中）；代わりに、これらの成分の両方は、同じベクター上にあることができる。これは、ＰＦおよびシャントの突然変異誘発によって達成される。

【０１０５】

合成分化ネットワークの特徴付け。分化ネットワークを、異なるリコンビナーゼの発現を異なるタイミングで誘導することにより試験する（図３７）。リコンビナーゼ発現の順列が検討され、状態と遷移は、フローサイトメトリー、顕微鏡法、ＰＣＲ、およびＤＮＡ配列決定を用いてモニタリングする。状態遷移の効率および各状態の安定性が、回路トポロジーおよび入力の時間的な動力学にどのように依存するかを決定する。低、中間および高レベルのリコンビナーゼを、ＷＤＲ回路を用いて発現して、異なるレベルが状態遷移の忠実性と偶然性にどのように影響するかを決定する。リコンビナーゼ発現の中間レベルは、混合集団につながり得る。拡張として、反転の方向を、リコンビナーゼ＋リコンビナーゼ方向性因子（ＲＤＦ）の発現を介して逆転することが、どのように状態機械の動作に影響を与えるかを探索する［６３］。この仕事は、複雑な合成分化ネットワークと、チューニング動作に使用することができる複数のつまみの、最初の実証を提供する。

【０１０６】

例５．状態機械回路

本明細書で提供されるのは、生物学的回路を構築するために使用することができ、単純な状態機械表現（例えば、コンピュータサイエンスから）で複雑なシステムのモデル化を可能にする、論理／メモリシステムである。例えば、本発明の論理／メモリシステムは、入力（例えば、化学物質に基づく、またはリコンビナーゼに基づく入力）の順序および識別に応じて、固有状態間の細胞の遷移のために使用することができる。これの１つの非限定的な例は、ｎ個入力－２ｎ個出力回路であり、これは、使用されるｎ個の入力の組み合わせに基づいて、２ｎ個の出力のうちの１つの選択を可能にする（図３８Ａ～３８Ｅ、３９Ａ～３９Ｃ）。一般に、状態機械の概念はスケーラブルであり、ｎ個入力から2^n個出力を可能にする。

本例で用いた論理ゲートを、図３８Ａに図式化する。論理ゲート１は、２つの出力核酸：１つは青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）をコードし、および他の１つは黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）をコードする、を含む。同族phiC31リコンビナーゼ認識部位（ＲＲＳ）は括弧で表され、同族Bxb1 ＲＲＳは三角形で表されている。論理ゲート２も同様に、２つの出力核酸：１つは赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）をコードし、および他の１つは緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードする、を含む。論理ゲート１および２は、本明細書において「４色システム」として言及される。

【０１０７】

１つの実験において、細胞を、４色システムおよび２つのリコンビナーゼ、すなわちPhiC31リコンビナーゼとBxb1リコンビナーゼを含むプラスミドを用いて、それぞれアラビノ

ース誘導性プロモーターおよびＩＰＴＧ誘導性プロモーターの制御下で、形質転換した（図３８Ｂ）。細胞は、誘導物質を含まない培地中で一晩増殖させ、次いで、ＩＰＴＧのみ、ＩＰＴＧと続いてアラビノース、アラビノース、またはアラビノースと続いてＩＰＴＧに曝露した（図３８）。図３８は、ＩＰＴＧのみに曝露した細胞におけるＲＦＰの蛍光、ＩＰＴＧと続いてアラビノースに曝露した細胞におけるＧＦＰの蛍光、アラビノースのみに曝露した細胞におけるＢＦＰの蛍光、およびアラビノースと続いてＩＰＴＧに曝露した細胞におけるＹＦＰの蛍光を示す。

【０１０８】

別の実験において、細胞を、４色システムおよび２つのリコンビナーゼ、すなわちPhiC31リコンビナーゼとBxb1リコンビナーゼを含むプラスミドを用いて、リボレギュレーターの制御下で形質転換した（図３９Ａ）。細胞は、誘導物質（ａＴｃおよびＡＨＬ）を含まない培地中で一晩増殖させ、翌日遠心分離し、洗浄し、１：２０００に希釈した。細胞を、１つの入力誘導物質ａＴｃの５０ｎｇ／ｍｌ、２００ｎｇ／ｍｌ、２５０ｎｇ／ｍｌの濃度に、それぞれ２、４、６、８、１０、１２および１４時間暴露した。次にＢＦＰの発現を、フローサイトメトリーを用いて測定した。出力核酸の発現は、ＰＣＲによっても確認した（データは示さず）。図４０Ａ～４０Ｄは、種々の入力濃度におけるＢＦＰ発現細胞のパーセンテージを、継時的にプロットしたグラフである。

ａＴｃで一晩誘導した細胞を、次に、遠心分離し、洗浄し、１：２０００に希釈し、別の誘導物質ＡＨＬの１μＭ、１０μＭ、５０μＭ、１００μＭの濃度に、それぞれ２、４、６、８、１０、１２および１４時間暴露した。次にＹＦＰの発現を、フローサイトメトリーを用いて測定した。出力核酸の発現は、ＰＣＲによっても確認した（データは示さず）。図４１Ａ～４１Ｅは、種々の入力濃度におけるＹＦＰ発現細胞のパーセンテージを、継時的にプロットしたグラフである。

【０１０９】

実験方法

全ての実験は、Luria-Bertani（ＬＢ）-Miller培地（Fisher＃BP1426-2）中、適切な抗生物質を次の濃度で使用して実施した：カルベニシリン（５０μｇ／ｍｌ）、カナマイシン（３０μｇ／ｍｌ）、およびクロラムフェニコール（２５μｇ／ｍｌ）。

リコンビナーゼに基づく計算プラスミド構築

全てのプラスミドは、基本的な分子クローニング技術［２７］およびギブソン・アセンブリ［２８］を用いて構築した。New England Biolab (NEB)制限エンドヌクレアーゼ、Ｔ４ ＤＮＡリガーゼ、およびPHUSION（登録商標）ＰＣＲキットを使用した。ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）は、Bio-Rad S1000（商標）Thermal Cycler With Dual 48/48 Fast Reaction Modules（BioRad）で行った。リコンビナーゼ認識部位を含むカスタム配列は、Integrated DNA Technologies（Coralville, IA）から構築した。

【０１１０】

全てのプラスミドは、大腸菌株DH5αPRO（F-φ80lacZΔM15Δ（lacZYA-argF）U169 deoR recA1 endA1 hsdR17（rk-、MK +）phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1λ-, PN25/tetR, Placiq/lacI, Spr）に標準的なプロトコルで形質転換し、QIAprep（登録商標）Spin Miniprep Kits（Qiagen）を用いて単離した。プラスミド修飾は、制限消化およびGenewiz（Cambridge, MA）による配列決定によって確認した。

pZA31Gに存在するプロモーターPLtet0-1およびリボソーム結合部位（ＲＢＳ）は、XhoIおよびKpnIによる切除を介して除去し、同じＲＢＳとのEagI制限部位で置換した。プロモーターおよび／または認識部位間に配置されたターミネーター、および認識部位間に配置されていない下流のgfp、から構成される、リコンビナーゼに基づく計算デバイスの全構成要素を、次に、pZA31G CmR内のAatIIおよびXhoI制限部位の間にギブソン・アセンブルした。他の全ての設計物（すなわち、認識部位の間に位置するgfpを含んだもの）は、AatIIおよびAvrII制限部位の間にギブソン・アセンブルした。

【０１１１】

Bxb1遺伝子は、Callura et al.からのリボレギュレーターベクターrrjc12y（rii）gの

変異体に、制限部位KpnIおよびHindIIIの間にクローニングした［２９，３０］。この高コピー数プラスミドは、カナマイシン耐性および、ｔａＲＮＡ（トランス活性化ＲＮＡ）バージョンtaR12yおよびBxb1の転写を駆動するPLuxIプロモーターを含む。Bxb1遺伝子は、ＲＢＳの上流にcrR12yシス抑制配列を有する。

phiC31遺伝子は、Addgeneプラスミド18941（Cambridge, MA）から入手した。phiC31遺伝子を、Callura et al.からのリボレギュレーターベクターrrjt12（11）gの変異体に、制限部位KpnIとPstIの間にクローニングした［２９，３０］。この中コピー数のプラスミドは、カルベニシリン耐性および、ｔａＲＮＡバージョンtaR12とphiC31の両方の転写を駆動するPLtet0-1プロモーターを含む。phiC31遺伝子は、ＲＢＳの上流にcrR12シス抑制配列を有する。

【０１１２】

ギブソン・アセンブリ

ギブソン・アセンブリを用いて、プロモーター（ｐｒｏＤ）［５］、ターミネーター（Ｔ１）［６］、および出力遺伝子（gfp）［６］モジュール（表２）を一緒に結合して、単一ステップ反応で、統合論理／メモリプラスミドを実現した。

～４０塩基が配列中に重複するＤＮＡ断片を、ＰＣＲにより、隣接する断片との配列の重複を提供する「オーバーハング」を含むＰＣＲプライマーの設計を介して、構築した。Gibson et al.によるプロトコルに従った［２８］。簡単に言えば、ギブソン・アセンブリマスターミックスを、以下を添加して調製した：３２０μＬの５Ｘ ＩＳＯバッファ、０．６４μＬの１０Ｕ／μＬ Ｔ５エキソヌクレアーゼ、２０μＬの２Ｕ／μＬ PHUSION（登録商標）ポリメラーゼ、１６０μＬの４０Ｕ／μＬ Ｔａｑリガーゼ、および水を加えて１．２ｍＬとする。１５μＬのアリコートを調製し、単一のギブソン反応に使用した。次に、１００ｎｇの線状化ベクター骨格および等モル量の他のアセンブリの部分を、１５μＬのマスターミックスに添加し、２０μＬの総容量のアセンブリ反応混合物とした。アセンブリ反応物は、５０℃で６０分間インキュベートし、次に５μＬのアセンブリ反応物を、１００μＬのコンピテント大腸菌中に形質転換した。

【０１１３】

リコンビナーゼに基づく計算フローサイトメーター測定

フローサイトメーター測定を実行する前に、細胞を誘導物質を含まない培地中で一晩増殖させ、次いで、誘導物質アンヒドロテトラサイクリン（Sigma）を２０ｎｇ／ｍＬの最終濃度で、および／またはＮ－アシルホモセリンラクトン（ＡＨＬ）を１μＭの最終濃度で含む培地中に、１：１０００希釈した。細胞を、誘導物質中（単数または複数）で４時間増殖させ、洗浄し、１：１０００希釈し、誘導物質中（単数または複数）３７℃および３００ｒｐｍで一晩増殖させた。次に、細胞を遠心分離し、誘導物質を含まない培地で洗浄した。細胞を次に１：１００希釈して、新鮮な１×リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を含有する新しい９６ウェルプレートに入れ、直ちにBD FACS-LSRFortessa-HTS細胞分析装置（BD biosciences, CA）を用いてアッセイした。FlowJo（Treestar、OR）を、データ解析と可視化のために使用した。蛍光は、４８８ｎｍのアルゴンレーザー励起および５１５ｎｍ～５４５ｎｍの発光フィルターで測定した。試料間の一貫性を確保するために、５０，０００個の細胞を各試料について収集し、ゲーティングした。一貫性のある閾値を適用して、ＧＦＰ陽性（オン状態）またはＧＦＰ陰性（オフ状態）とみなされる細胞の割合を決定した（図５）。ＧＦＰを発現する細胞のパーセンテージは、３回の独立した実験について平均した。エラーバーは平均値の標準誤差を表わす。

【０１１４】

複数世代にわたる安定したメモリの維持

我々のリコンビナーゼに基づくメモリデバイスの経時安定性を試験するために、上記のように、ＡＮＤゲートを含む細胞をオフからオンに誘導した。これらの細胞を次に、誘導物質を含まない培地中で９日間繰り返し増殖させ、毎日１：２０００希釈して、１日あたり１１世代を達成した。それらの状態を維持する細胞の能力は、それぞれ、本明細書に記載のように、フローサイトメトリーを使用して緑色蛍光タンパク質の発現を測定すること

によりモニタリングした。本発明の論理／メモリシステムは、少なくとも～９０回の細胞倍加について状態を保持した。これらのデータは、システムの長期的な操作安定性を示す。

【０１１５】

細胞死の後の安定したメモリの維持

ＮＯＲゲートを含む細胞は、一晩、入力なし、ＡＨＬのみ、ａＴｃのみ、およびＡＨＬとａＴｃの両方に暴露し、遠心分離し、洗浄した後、これらを９０℃で３０分間暴露することによって死滅させた。ＰＣＲは、製造業者の説明書に従ってPHUSION（登録商標）ＰＣＲキット（New England Biolab）を用いて、死細胞から単離されたＤＮＡに対して実施した。ＰＣＲは、Bio-Rad S1000（商標）Thermal Cycler With Dual 48/48 Fast Reaction Modules（BioRad）で実施した。ＰＣＲ産物を１％アガロースゲル上での電気泳動により分析した。

図４で使用した具体的プライマー：

Ｐ１：GGC GCG TAC TCC TAA GAA AC（配列番号１）

Ｐ２：TCT CCG TCG TCA GGA TCA TC（配列番号２）

Ｐ３：ATT AAA GAG GAG AAA GGT ACC ATG C（配列番号３）

Ｐ４：AAA GTT AAA CAA AAT TAT TTG TAG AGG G（配列番号４）

【０１１６】

【表２－１】

表2. 統合論理／メモリを実現するために用いる合成部分

部品の名称	部品の種類	配列	ソース
proD	プロモーター	CACAGCTAACACCACGTCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTAT GAGTGGTTGCTGGATAACTTTACGGGCATGCATAAGGCTCGTAT AATATATTCAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTACAAATAATTT TGTTTAACTTT(配列番号5)	31
T1	一方向性ターミネーター	GGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTT CGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACA AATCCGCCGCCCTAGA(配列番号6)	32
gfp	出力遺伝子	ATGCGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTT GTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGT GGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACTTACCCTTAA ATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACT TGTCACTACTTTCGGTTATGGTGTTCAATGCTTTGCGAGATACCC AGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCG AAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGA ACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTT GTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGA AACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACTATAACTCACACAAT GTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAA CTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAG CAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTC CTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCG AAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTT TGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACA AATAA(配列番号7)	32

【０１１７】

【表２－２】

部品の名称	部品の種類	配列	ソース
Bxb1	リコンビナーゼ	ATGAGAGCCCTGGTAGTCATCCGCCTGTCCCGCGTCACCGATGC TACGACTTCACCGGAGCGTCAGCTGGAGTCTTGCCAGCAGCTCT GCGCCCAGCGCGGCTGGGACGTCGTCGGGGTAGCGGAGGATCT GGACGTCTCCGGGGCGGTCGATCCGTTCGACCGGAAGCGCAGA CCGAACCTGGCCCGGTGGCTAGCGTTCGAGGAGCAACCGTTCG ACGTGATCGTGGCGTACCGGGTAGACCGGTTGACCCGATCGATC CGGCATCTGCAGCAGCTGGTCCACTGGGCCGAGGACCACAAGA AGCTGGTCGTCTCCGCGACCGAAGCGCACTTCGATACGACGACG CCGTTTGCGGCGGTCGTCATCGCGCTTATGGGAACGGTGGCGCA GATGGAATTAGAAGCGATCAAAGAGCGGAACCGTTCGGCTGCGC ATTTCAATATCCGCGCCGGGAAATACCGAGGATCCCTGCCGCCG TGGGGATACCTGCCTACGCGCGTGGACGGGGAGTGGCGGCTGG TGCCGGACCCTGTGCAGCGAGAGCGCATCCTCGAGGTGTATCAC CGCGTCGTCGACAACCACGAGCCGCTGCACCTGGTGGCCCACG ACCTGAACCGGCGTGGTGTCCTGTCGCCGAAGGACTACTTCGCG CAGCTGCAAGGCCGCGAGCCGCAGGGCCGGGAGTGGTCGGCTA CCGCGCTGAAGCGATCGATGATCTCCGAGGCGATGCTCGGGTAC GCGACTCTGAACGGTAAGACCGTCCGAGACGACGACGGAGCCC CGCTGGTGCGGGCTGAGCCGATCCTGACCCGTGAGCAGCTGGA GGCGCTGCGCGCCGAGCTCGTGAAGACCTCCCGGGCGAAGCCC GCGGTGTCTACCCCGTCGCTGCTGCTGCGGGTGTTGTTCTGCGC GGTGTGCGGGGAGCCCGCGTACAAGTTCGCCGGGGGAGGACGT AAGCACCCGCGCTACCGCTGCCGCTCGATGGGGTTCCCGAAGC ACTGCGGGAACGGCACGGTGGCGATGGCCGAGTGGGACGCGTT CTGCGAGGAGCAGGTGCTGGATCTGCTCGGGGACGCGGAGCGT CTGGAGAAAGTCTGGGTAGCCGGCTCGGACTCCGCGGTCGAACT CGCGGAGGTGAACGCGGAGCTGGTGGACCTGACGTCGCTGATC GGCTCCCCGGCCTACCGGGCCGGCTCTCCGCAGCGAGAAGCAC TGGATGCCCGTATTGCGGCGCTGGCCGCGCGGCAAGAGGAGCT GGAGGGTCTAGAGGCTCGCCCGTCTGGCTGGGAGTGGCGCGAG ACCGGGCAGCGGTTCGGGGACTGGTGGCGGGAGCAGGACACCG CGGCAAAGAACACCTGGCTTCGGTCGATGAACGTTCGGCTGACG TTCGACGTCCGCGGCGGGCTGACTCGCACGATCGACTTCGGGG ATCTGCAGGAGTACGAGCAGCATCTCAGGCTCGGCAGCGTGGTC GAACGGCTACACACCGGGATGTCGTAG（配列番号８）	33
Bxb1 *attB*	リコンビナーゼ認識部位	TCGGCCGGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCAT CCGGGC（配列番号９）	33
Bxb1 *attP*	リコンビナーゼ認識部位	GTCGTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACG GTACAAACCCCGAC（配列番号１０）	33
phiC31	リコンビナーゼ	ATGACACAAGGGGTTGTGACCGGGGTGGACACGTACGCGGGTG CTTACGACCGTCAGTCGCGCGAGCGCGAGAATTCGAGCGCAGC AAGCCCAGCGACACAGCGTAGCGCCAACGAAGACAAGGCGGCC GACCTTCAGCGCGAAGTCGAGCGCGACGGGGGCCGGTTCAGGT TCGTCGGGCATTTCAGCGAAGCGCCGGGCACGTCGGCGTTCGG GACGGCGGAGCGCCCGGAGTTCGAACGCATCCTGAACGAATGC CGCGCCGGGCGGCTCAACATGATCATTGTCTATGACGTGTCGCG CTTCTCGCGCCTGAAGGTCATGGACGCGATTCCGATTGTCTCGG AATTGCTCGCCCTGGGCGTGACGATTGTTTCCACTCAGGAAGGC GTCTTCCGGCAGGGAAACGTCATGGACCTGATTCACCTGATTAT GCGGCTCGACGCGTCGCACAAAGAATCTTCGCTGAAGTCGGCGA	34

【０１１８】

【表２－３】

部品の名称	部品の種類	配列	ソース
		AGATTCTCGACACGAAGAACCTTCAGCGCGAATTGGGCGGGTAC GTCGGCGGGAAGGCGCCTTACGGCTTCGAGCTTGTTTCGGAGAC GAAGGAGATCACGCGCAACGGCCGAATGGTCAATGTCGTCATCA ACAAGCTTGCGCACTCGACCACTCCCCTTACCGGACCCTTCGAG TTCGAGCCCGACGTAATCCGGTGGTGGTGGCGTGAGATCAAGAC GCACAAACACCTTCCCTTCAAGCCGGGCAGTCAAGCCGCCATTC ACCCGGGCAGCATCACGGGGCTTTGTAAGCGCATGGACGCTGAC GCCGTGCCGACCCGGGGCGAGACGATTGGGAAGAAGACCGCTT CAAGCGCCTGGGACCCGGCAACCGTTATGCGAATCCTTCGGGAC CCGCGTATTGCGGGCTTCGCCGCTGAGGTGATCTACAAGAAGAA GCCGGACGGCACGCCGACCACGAAGATTGAGGGTTACCGCATT CAGCGCGACCCGATCACGCTCCGGCCGGTCGAGCTTGATTGCG GACCGATCATCGAGCCCGCTGAGTGGTATGAGCTTCAGGCGTGG TTGGACGGCAGGGGGCGCGGCAAGGGGCTTTCCCGGGGGCAAG CCATTCTGTCCGCCATGGACAAGCTGTACTGCGAGTGTGGCGCC GTCATGACTTCGAAGCGCGGGGAAGAATCGATCAAGGACTCTTA CCGCTGCCGTCGCCGGAAGGTGGTCGACCCGTCCGCACCTGGG CAGCACGAAGGCACGTGCAACGTCAGCATGGCGGCACTCGACA AGTTCGTTGCGGAACGCATCTTCAACAAGATCAGGCACGCCGAA GGCGACGAAGAGACGTTGGCGCTTCTGTGGGAAGCCGCCCGAC GCTTCGGCAAGCTCACTGAGGCGCCTGAGAAGAGCGGCGAACG GGCGAACCTTGTTGCGGAGCGCGCCGACGCCCTGAACGCCCTT GAAGAGCTGTACGAAGACCGCGCGGCAGGCGCGTACGACGGAC CCGTTGGCAGGAAGCACTTCCGGAAGCAACAGGCAGCGCTGAC GCTCCGGCAGCAAGGGGCGGAAGAGCGGCTTGCCGAACTTGAA GCCGCCGAAGCCCCGAAGCTTCCCCTTGACCAATGGTTCCCCGA AGACGCCGACGCTGACCCGACCGGCCCTAAGTCGTGGTGGGGG CGCGCGTCAGTAGACGACAAGCGCGTGTTCGTCGGGCTCTTCGT AGACAAGATCGTTGTCACGAAGTCGACTACGGGCAGGGGGCAG GGAACGCCCATCGAGAAGCGCGCTTCGATCACGTGGGCGAAGC CGCCGACCGACGACGACGAAGACGACGCCCAGGACGGCACGGA AGACGTAGCGGCGTAG(配列番号11)	
phiC31 attB	リコンビナーゼ認識部位	TGCGGGTGCCAGGGCGTGCCCTTGGGCTCCCCGGGCGCGTACT CC(配列番号12)	34
phiC31 attP	リコンビナーゼ認識部位	GTGCCCCAACTGGGGTAACCTTTGAGTTCTCTCAGTTGGGGG (配列番号13)	34
proA	プロモーター	CACAGCTAACACCACGTCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTAT GAGTGGTTGCTGGATAACTTTACGGGCATGCATAAGGCTCGTAG GCTATATTCAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTACAAATAATTT TGTTTAACTTT(配列番号14)	31
proC	プロモーター	CACAGCTAACACCACGTCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTAT GAGTGGTTGCTGGATAACTTTACGGGCATGCATAAGGCTCGTAT GATATATTCAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTACAAATAATTT TGTTTAACTTT(配列番号15)	31

【０１１９】

参考文献：下記参考文献の各々は、本明細書に参照により組み込まれる。

【表３－１】

1. Hasty, J., McMillen, D. & Collins, J. J. Engineered gene circuits. Nature 420, 224-230, doi:10.1038/nature01257 nature01257 [pii] (2002).

2. Regot, S. *et al.* Distributed biological computation with multicellular engineered networks. Nature 469, 207-211, doi:10.1038/nature09679 (2011).

3. Auslander, S., Auslander, D., Muller, M., Wieland, M. & Fussenegger, M. Programmable single-cell mammalian biocomputers. Nature 487, 123-127, doi:10.1038/nature11149 (2012).

4. Nissim, L. & Bar-Ziv, R. H. A tunable dual-promoter integrator for targeting of cancer cells. Mol Syst Biol 6, 444, doi:10.1038/msb.2010.99 (2010).

5. Ajo-Franklin, C. M. *et al.* Rational design of memory in eukaryotic cells. Gene Dev 21, 2271-2276, doi:Doi 10.1101/Gad.1586107 (2007).

6. Elowitz, M. B. & Leibler, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. Nature 403, 335-338, doi:10.1038/35002125 (2000).

【０１２０】

【表３－２】

7. Tamsir, A., Tabor, J. J. & Voigt, C. A. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical 'wires'. Nature, doi:nature09565 [pii] 10.1038/nature09565 (2010).

8. Benenson, Y. Biomolecular computing systems: principles, progress and potential. Nat Rev Genet 13, 455-468, doi:10.1038/nrg3197 (2012).

9. Friedland, A. E. *et al.* Synthetic gene networks that count. Science 324, 1199-1202, doi:324/5931/1199 [pii] 10.1126/science.1172005 (2009).

10. Ham, T. S., Lee, S. K., Keasling, J. D. & Arkin, A. P. Design and construction of a double inversion recombination switch for heritable sequential genetic memory. PLoS One 3, e2815, doi:10.1371/journal.pone.0002815 (2008).

11. Ghosh, P., Pannunzio, N. R. & Hatfull, G. F. Synapsis in phage Bxb1 integration: selection mechanism for the correct pair of recombination sites. J Mol Biol 349, 331-348, doi:10.1016/j.jmb.2005.03.043 (2005).

12. Kim, A. I. *et al.* Mycobacteriophage Bxb1 integrates into the Mycobacterium smegmatis groEL1 gene. Mol Microbiol 50, 463-473 (2003).

13. Groth, A. C., Olivares, E. C., Thyagarajan, B. & Calos, M. P. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5995-6000, doi:10.1073/pnas.090527097 (2000).

14. Callura, J. M., Cantor, C. R. & Collins, J. J. Genetic switchboard for synthetic biology applications. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 5850-5855, doi:10.1073/pnas.1203808109 (2012).

15. Tabor, J. J. *et al.* A synthetic genetic edge detection program. Cell 137, 1272-1281, doi:S0092-8674(09)00509-1 [pii] 10.1016/j.cell.2009.04.048 (2009).

16. Win, M. N. & Smolke, C. D. Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices. Science 322, 456-460, doi:322/5900/456 [pii]10.1126/science.1160311 (2008).

17. Rinaudo, K. *et al.* A universal RNAi-based logic evaluator that operates in mammalian cells. Nat Biotechnol 25, 795-801, doi:10.1038/nbt1307 (2007).

18. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature methods 6, 343-345, doi:10.1038/nmeth.1318 (2009).

【０１２１】

【表３－３】

19. Bonnet, J., Subsoontorn, P. & Endy, D. Rewritable digital data storage in live cells via engineered control of recombination directionality. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 8884-8889, doi:10.1073/pnas.1202344109 (2012).

20. Groth, A. C. & Calos, M. P. Phage integrases: biology and applications. J Mol Biol 335, 667-678, doi:S0022283603013561 [pii] (2004).

21. Gordley, R. M., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F., 3rd. Synthesis of programmable integrases. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 5053-5058, doi:0812502106 [pii] 10.1073/pnas.0812502106 (2009).

22. Lux, M. W., Bramlett, B. W., Ball, D. A. & Peccoud, J. Genetic design automation: engineering fantasy or scientific renewal? Trends in Biotechnology 30, 120-126 (2012).

23. Jang, S. S., Oishi, K. T., Egbert, R. G. & Klavins, E. Specification and Simulation of Synthetic Multicelled Behaviors. ACS Synthetic Biology 1, 365-374, doi:10.1021/sb300034m (2012).

24. McMillen, D., Kopell, N., Hasty, J. & Collins, J. J. Synchronizing genetic relaxation oscillators by intercell signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 679-684, doi:10.1073/pnas.02264229999/2/679 [pii] (2002).

25. You, L., Cox, R. S., Weiss, R. & Arnold, F. H. Programmed population control by cell-cell communication and regulated killing. Nature 428, 868-871 (2004).

26. Bacchus, W. *et al.* Synthetic two-way communication between mammalian cells. Nat Biotech 30, 991-996, doi:http://www.nature.com/nbt/journal/v30/n10/abs/nbt.2351.html - supplementary-information (2012).

27. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Laboratory Press 2 (1989).

28. Gibson, D.G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature methods 6, 343-345 (2009).

29. Isaacs, F.J. et al. Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. Nat Biotechnol 22, 841-847 (2004).

30. Callura, J.M., Cantor, C.R. & Collins, J.J. Genetic switchboard for synthetic biology applications. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 5850-5855 (2012).

31. Davis, J.H., Rubin, A.J. & Sauer, R.T. Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters. Nucleic Acids Res 39, 1131-1141 (2011).

【０１２２】

【表３－４】

32. Friedland, A.E. et al. Synthetic gene networks that count. Science 324, 1199-1202 (2009).

33. Ghosh, P., Pannunzio, N.R. & Hatfull, G.F. Synapsis in phage Bxb1 integration: selection mechanism for the correct pair of recombination sites. J Mol Biol 349, 331-348 (2005).

34. Groth, A.C., Olivares, E.C., Thyagarajan, B. & Calos, M.P. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5995-6000 (2000).

35. Kilby, N.J., Trends Genet. 9, 413 (December, 1993).

36. Haynes, K.A., J Biol Eng 2, 8 (2008).

37. Ham, T.S., Biotechnol Bioeng 94, 1 (2006).

38. Datsenko, K.A., Proc Natl Acad Sci USA 97, 6640 (2000).

39. Ow & Ausubel, J. Bacteriol. 155, 704-713 (1983).

40. Lorbach et al., J. Mol. Biol., 296, 1175-81 (2000).

41. Loessner et al., Mol. Micro. 35, 324-340 (2000).

42. Matsuura et al., J Bacteriol. 178, 3374-3376 (1996).

43. Cheng, A.A. & Lu, T.K. Synthetic Biology: An Emerging Engineering Discipline. Annual review of biomedical engineering 14, 155-178 (2012).

44. Lu, T.K., Khalil, A.S. & Collins, J.J. Next-generation synthetic gene networks. Nat Biotechnol 27, 1139-1150 (2009).

45. Mijakovic, I., Petranovic, D. & Jensen, P.R. Tunable promoters in systems biology. Current Opinion in Biotechnology 16, 329-335 (2005).

46. Thomson, J.G. & Ow, D.W. Site-specific recombination systems for the genetic manipulation of eukaryotic genomes. Genesis 44, 465-476 (2006).

47. Bai Flagfeldt, D., Siewers, V., Huang, L. & Nielsen, J. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae. Yeast 26, 545-551 (2009).

48. Voth, W.P., Richards, J.D., Shaw, J.M. & Stillman, D.J. Yeast vectors for integration at the HO locus. Nucleic Acids Research 29, e59 (2001).

49. Gerasimova, T.I. & Corces, V.G. CHROMATIN INSULATORS AND BOUNDARIES: Effects on Transcription and Nuclear Organization. Annual Review of Genetics 35, 193-208 (2001).

【０１２３】

【表３－５】

50. Grilly, C., Stricker, J., Pang, W.L., Bennett, M.R. & Hasty, J. A synthetic gene network for tuning protein degradation in Saccharomyces cerevisiae. Mol Syst Biol 3, 127 (2007).

51. Ferreira, J.P., Overton, K.W. & Wang, C.L. Tuning gene expression with synthetic upstream open reading frames. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 11284-11289 (2013).

52. Dvir, S., Velten, L., Sharon, E., Zeevi, D., Carey, L.B., Weinberger, A. & Segal, E. Deciphering the rules by which 5′-UTR sequences affect protein expression in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences (2013).

53. Blount, B.A., Weenink, T., Vasylechko, S. & Ellis, T. Rational diversification of a promoter providing fine-tuned expression and orthogonal regulation for synthetic biology. PLoS One 7, e33279 (2012).

54. Ringrose, L., Chabanis, S., Angrand, P.O., Woodroofe, C. & Stewart, A.F. Quantitative comparison of DNA looping in vitro and in vivo: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances. EMBO J 18, 6630-6641 (1999).

55. Lindstrom, D.L. & Gottschling, D.E. The Mother Enrichment Program: A Genetic System for Facile Replicative Life Span Analysis in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 183, 413-422 (2009).

56. Colman-Lerner, A., Chin, T.E. & Brent, R. Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. Cell 107, 739-750 (2001).

57. Bennett, M.R. & Hasty, J. Microfluidic devices for measuring gene network dynamics in single cells.Nat Rev Genet 10, 628-638 (2009).

58. Daniel, R., Rubens, J.R., Sarpeshkar, R. & Lu, T.K. Synthetic analog computation in living cells. Nature 497, 619-623 (2013).

59. Neuteboom, L.W., Lindhout, B.I., Saman, I.L., Hooykaas, P.J. & van der Zaal, B.J. Effects of different zinc finger transcription factors on genomic targets. Biochem Biophys Res Commun 339, 263-270 (2006).

60. Kim, S., Kim, E.J. & Kim, J.S. Construction of combinatorial libraries that encode zinc finger-based transcription factors. Methods Mol Biol 649, 133-147 (2010).

61. Kang, J.S. & Kim, J.S. Zinc finger proteins as designer transcription factors. J Biol Chem 275, 8742-8748 (2000).

【０１２４】

【表３－６】

62. Blancafort, P., Chen, E.I., Gonzalez, B., Bergquist, S., Zijlstra, A., Guthy, D., Brachat, A., Brakenhoff, R.H., Quigley, J.P., Erdmann, D. & Barbas, C.F., 3rd. Genetic reprogramming of tumor cells by zinc finger transcription factors. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 11716-11721 (2005).

63. Ghosh, P., Wasil, L.R. & Hatfull, G.F. Control of phage Bxb1 excision by a novel recombination directionality factor. PLoS Biol 4, e186 (2006).

64. Ghosh, P., Kim, A.I. & Hatfull, G.F. The Orientation of Mycobacteriophage Bxb1 Integration Is Solely Dependent on the Central Dinucleotide of attP and attB. Molecular Cell 12, 1101-1111 (2003).

65. Ghosh, P., Bibb, L.A. & Hatfull, G.F. Two-step site selection for serine-integrase-mediated excision: DNA-directed integrase conformation and central dinucleotide proofreading. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 3238-3243 (2008).

66. Zhang, L., Wang, L., Wang, J., Ou, X., Zhao, G. & Ding, X. DNA Cleavage is Independent of Synapsis during Streptomyces Phage φBT1 Integrase-Mediated Site-Specific Recombination. Journal of Molecular Cell Biology 2, 264-275 (2010).

67. Nevozhay, D., Adams, R.M., Murphy, K.F., Josić, K. & Balázsi, G. Negative autoregulation linearizes the dose–response and suppresses the heterogeneity of gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 5123-5128 (2009).

68. Lou et al., Ribozyme-based insulator parts buffer synthetic circuits from genetic context. Nature Biotechnology 30, 1137–1142 (2012).

70. Qi et al., RNA processing enables predictable programming of gene expression. Nature Biotechnology 30,1002–1006 (2012).

71. Mutalik et al. Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. Nature Methods 10, 354–360 (2013).

72. Colloms et al. Rapid metabolic pathway assembly and modification using serine integrase site-specific recombination. Nucleic Acids Research. (2013) doi: 10.1093/nar/gkt1101.

【０１２５】

均等物

いくつかの発明の態様を本明細書に記載および例示してきたが、当業者は容易に、本明細書に記載された機能を実行する、および／または結果および／もしくは１または２以上の利点を得るための、種々の他の手段および／または構造を構想し、かかる変形および／または修正のそれぞれは、本明細書に記載の本発明の態様の範囲内であるとみなされる。より一般的に、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、および実際のパラメータ、寸法、材料、および／または構成は、特定の用途または本発明の教示が使用されるところの用途に依存することを、容易に理解するであろう。当業者は、日常的な実験のみを用いて、本明細書に記載の本発明の特定の態

様の均等物を認識し、または確認することができる。したがって、前述の態様は、ほんの一例として提示され、添付の特許請求の範囲およびその均等物の範囲内であり、本発明の態様は、具体的に説明され特許請求の範囲に記載された以外の方法で実施可能であることが、理解されるべきである。本開示の発明の態様は、個々の特徴、システム、物品、材料、キット、および／または本明細書に記載の方法に向けられている。さらに、２または３以上のかかる特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法の任意の組み合わせも、かかる特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法が互いに矛盾しない場合には、本開示の発明の範囲内に含まれる。

【０１２６】

本明細書中で定義され使用される全ての定義は、辞書の定義、参照により組み込まれた文書における定義、および／または定義された用語の通常の意味を支配すると理解されるべきである。

明細書および特許請求の範囲において本明細書中で使用される、不定冠詞「a」および「an」は、明確に逆が示されない限り、「少なくとも１つ」を意味すると理解されるべきである。

明細書および特許請求の範囲において本明細書中で使用される用語「および／または」は、そのように結合された要素、すなわち、いくつかの場合においては連結的に（conjunctively）存在し、他の場合においては離接的に（disjunctively）存在する要素の、「いずれかまたは両方」であると理解されるべきである。「および／または」で複数列挙された要素は同様に解釈されるべきであり、すなわち、そのように結合された要素の「１または２以上」である。他の要素も、「および／または」節によって具体的に識別された要素以外に、具体的に識別された要素に関連するかまたは非関連かに関わらず、任意に存在してよい。したがって、非限定的な例として、「Ａおよび／またはＢ」への言及は、例えば「含む」などのオープンエンドの言葉と組み合わせて使用される場合には、一態様においてはＡのみを（任意にＢ以外の要素を含む）；別の態様においてはＢのみを（任意にＡ以外の要素を含む）；さらに別の態様においてはＡとＢの両方を（任意に別の要素を含む）；などを指す。

【０１２７】

明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用される「または」は、上記に定義した「および／または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、リスト中の項目を分離する場合、「または」または「および／または」は、包括的である、すなわち、多数の要素またはリストされた要素の、少なくとも１つを、さらに１つより多くを含むこと、および任意にリストされていない追加の要素も含むことと解釈される。明確に逆が示されている用語、例えば「１つのみ」もしくは「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」は多数の要素またはリストされた要素の正確に１つの要素を含むことを指す。一般的に、本明細書で用いられる用語「または」は、「いずれか」、「の１つ」、「１つのみ」、または「正確に１つ」などの排他性の用語が先行する場合には、排他的代替物（すわなち「いずれか一方だが両方ではない」）を指すと解釈される。特許請求の範囲で使用される場合、「から本質的になる」は、特許法の分野で使用される通常の意味を有するものとする。

【０１２８】

明細書および特許請求の範囲において本明細書中で使用される語句「少なくとも１つ」は、１または２以上の要素のリストを参照する場合、要素のリスト内の任意の１または２以上の要素から選択された少なくとも１つの要素を意味すると理解されるべきであり、必ずしも、要素のリスト内に具体的に挙げられた全ての要素それぞれの少なくとも１つを含むのではなく、要素リスト内の要素の任意の組み合わせを除外しない。この定義はまた、語句「少なくとも１つ」が言及するところの要素のリスト内に具体的に識別される要素以外の要素も、具体的に識別される要素と関連するかまたは非関連かに関わらず、任意に存在することを許容する。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」（または同等に、「ＡまたはＢの少なくとも１つ」、または同等に、「Ａおよび／ま

たはＢの少なくとも１つ」）とは、一態様においては、少なくとも１つの、任意に１より多くのＡを含み、Ｂは不在である（および任意にＢ以外の要素を含む）；別の態様においては、少なくとも１つの、任意に１より多くのＢを含み、Ａは不在である（および任意にＡ以外の要素を含む）；さらに別の態様においては、少なくとも１つの、任意に１より多くのＡ、および少なくとも１つの、任意に１より多くのＢを含む（および任意に別の要素を含む）；などを指す。

【０１２９】

明らかに逆が示されない限り、１より多くのステップまたは行為を含む、本明細書において特許請求される任意の方法において、方法のステップまたは行為の順序は必ずしも、方法のステップまたは行為の順序が列挙されている順序に限定されないことも理解されるべきである。

本明細書中に開示される全ての参考文献、特許および特許出願は、それぞれが引用されている主題に関連して参照により組み込まれ、いくつかの場合においては、文書の全体が包含され得る。

特許請求の範囲において、および上記の明細書において、「含む（comprising）」、「含む（including）」、「担持する」、「有する」、「含有する」、「関与する」、「保持する」、「構成される」などの全ての移行句は、オープンエンドである理解されるべきであり、すなわち、これらを含むがこれらに限定されないことを意味する。「からなる」および「から本質的になる」の移行句のみは、米国特許庁の特許審査手続マニュアル、セクション２１１１．０３に記載されているように、それぞれクローズまたは半クローズの句である。

【図１－１】

計算部
GFP
図1-2へ
A
B
Out
A B Out
0 0 0
1 0 0
0 1 0
1 1 1
GFP発現細胞%
100
50
0
なし
AHL
aTc
両方

図1－1

【図１－２】

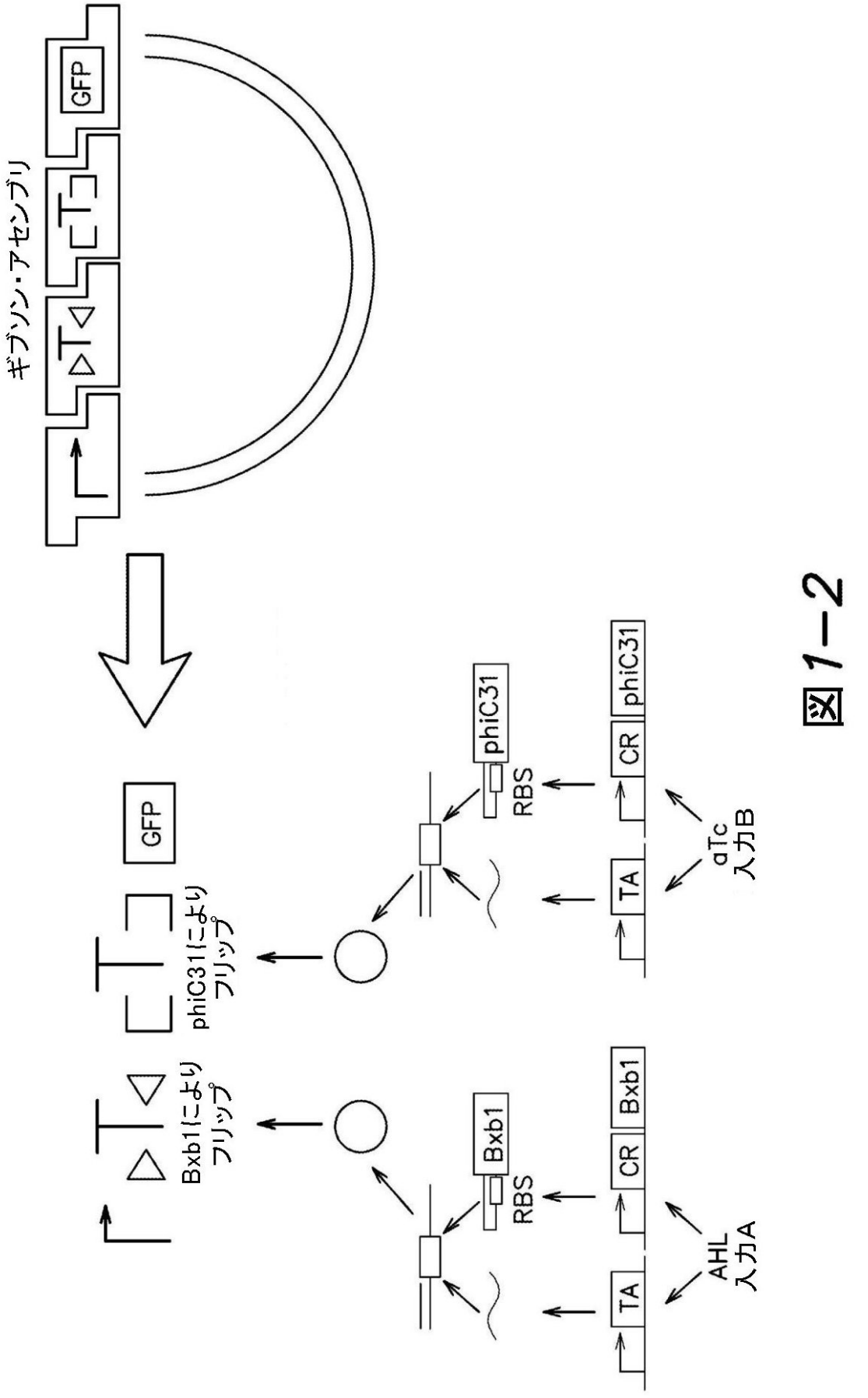

ギブソン・アセンブリ
GFP
Bxb1により
フリップ
phiC31により
フリップ
Bxb1
RBS
phiC31
RBS
TA
CR
Bxb1
TA
CR
phiC31
AHL
入力A
aTc
入力B

図1−2

【図２－１】

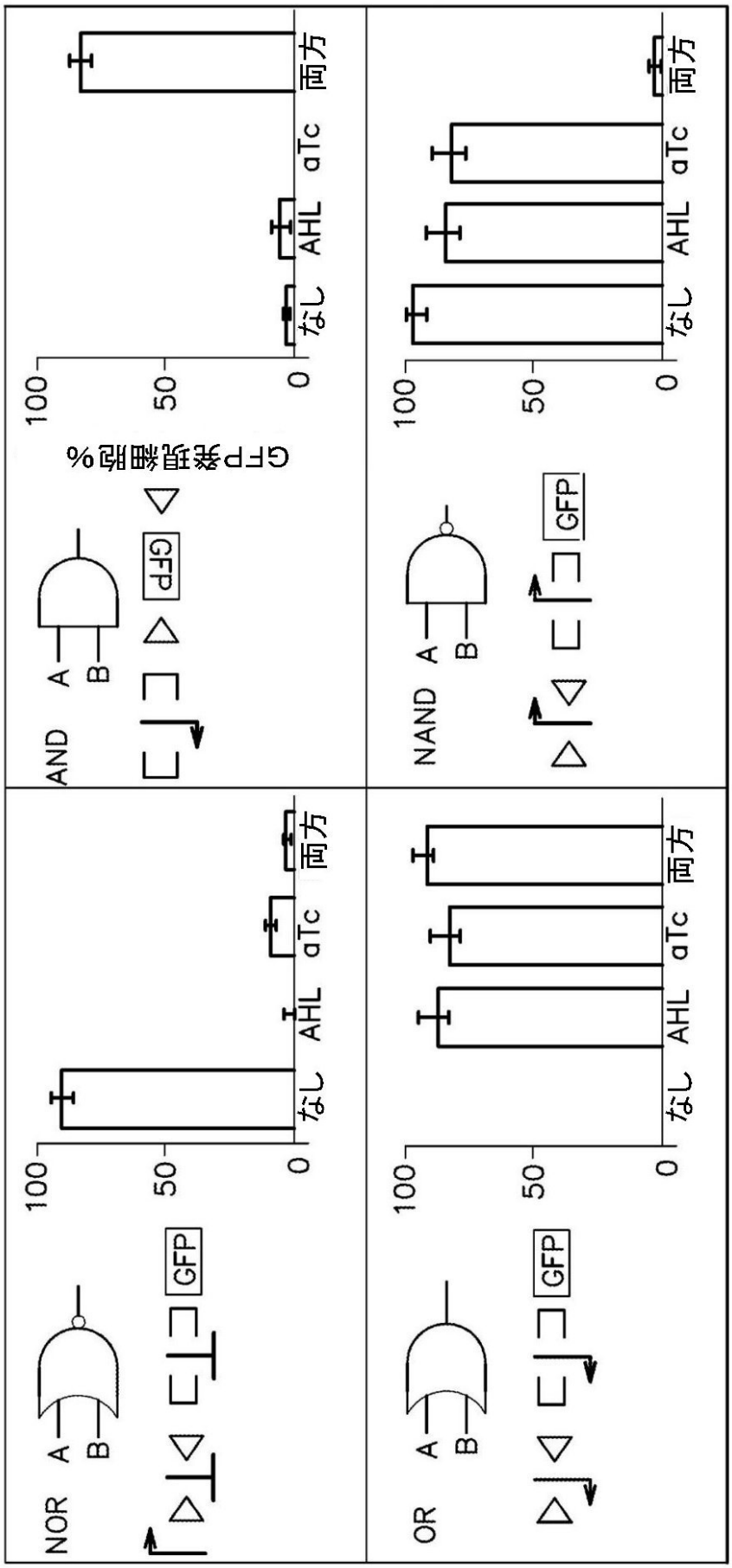


図2−1

【図２－２】

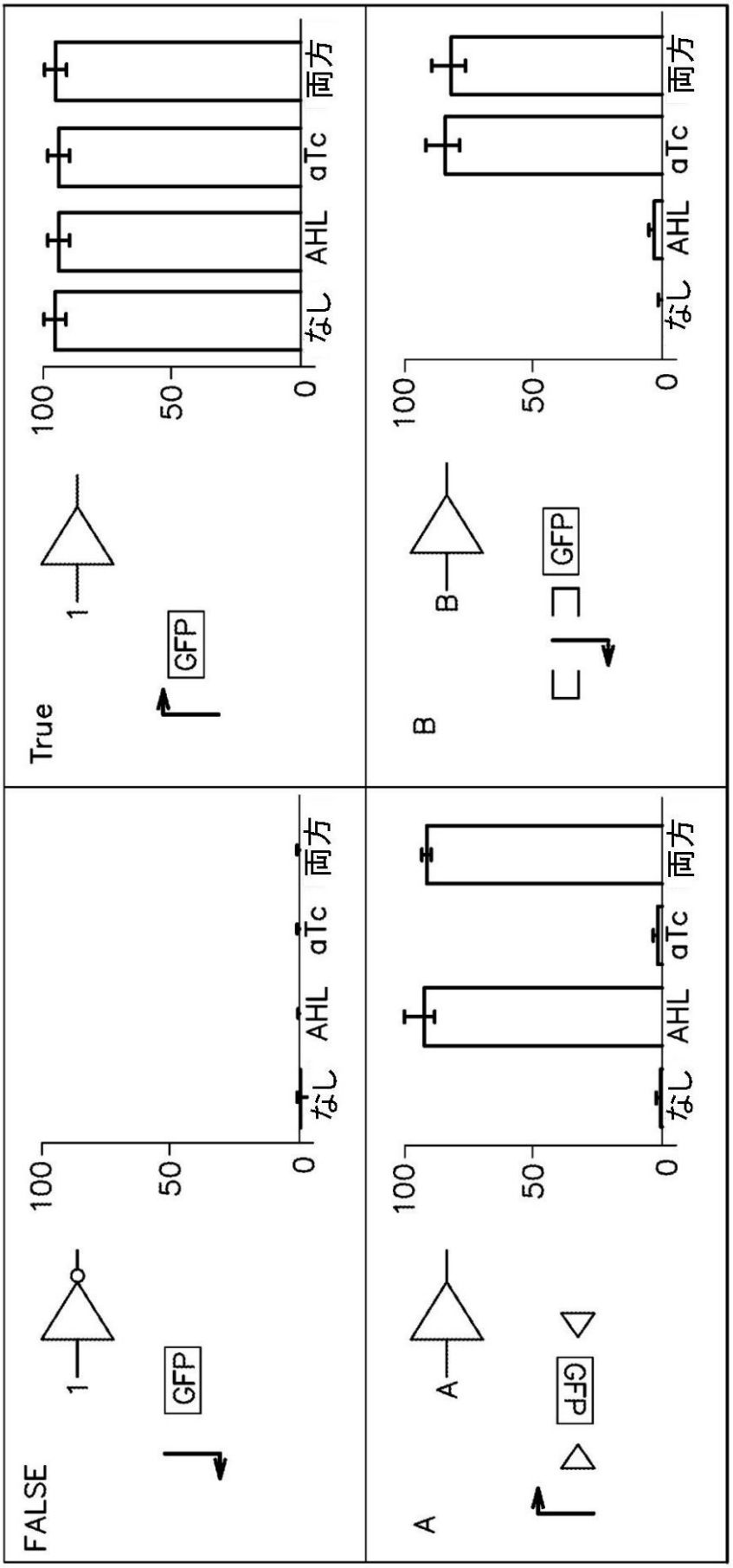


図２－２

【図２－３】

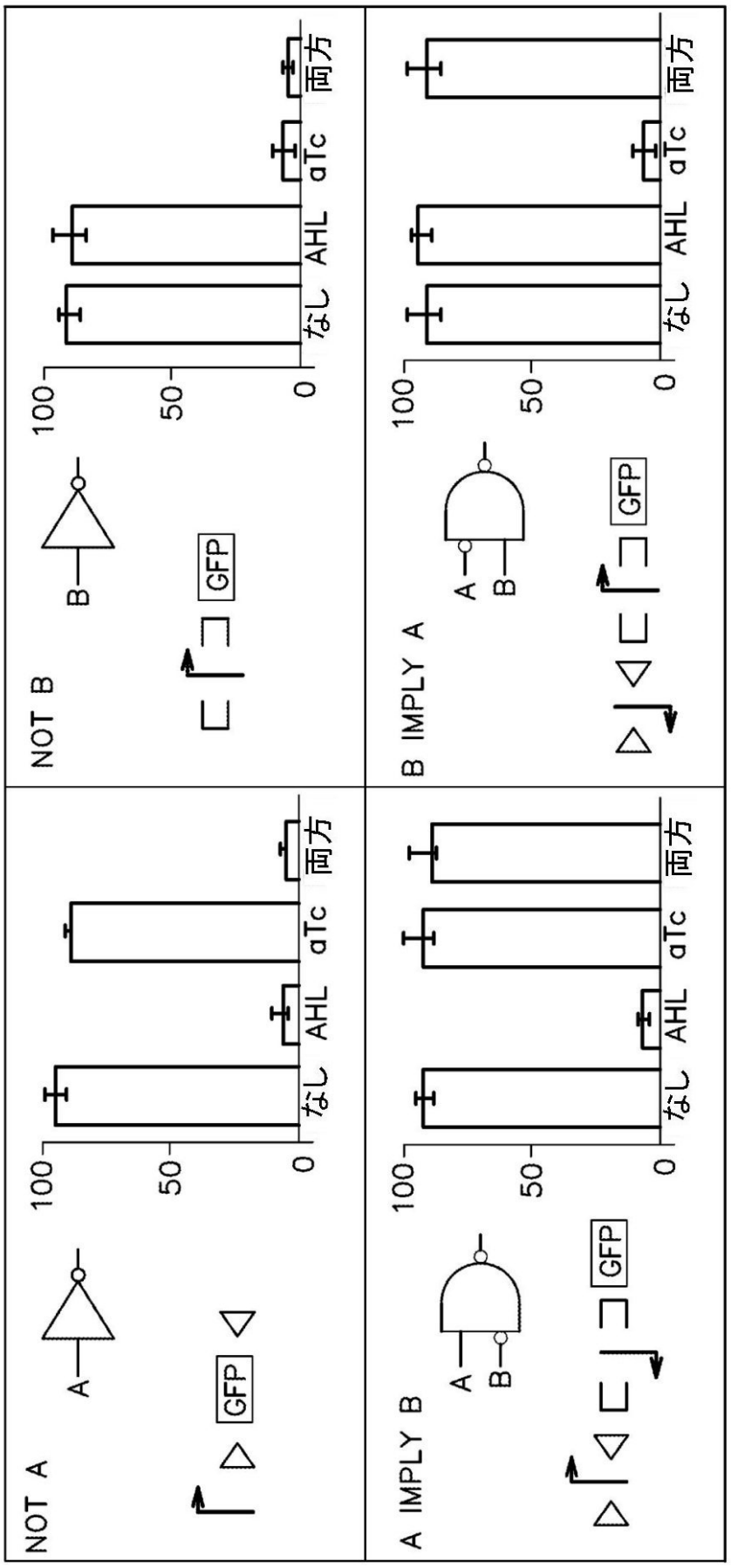

NOT A
A
GFP
100
50
0
なし
AHL
aTc
両方
NOT B
B
GFP
100
50
0
なし
AHL
aTc
両方
A IMPLY B
A
B
GFP
100
50
0
なし
AHL
aTc
両方
B IMPLY A
A
B
GFP
100
50
0
なし
AHL
aTc
両方

図2－3

【図２－４】

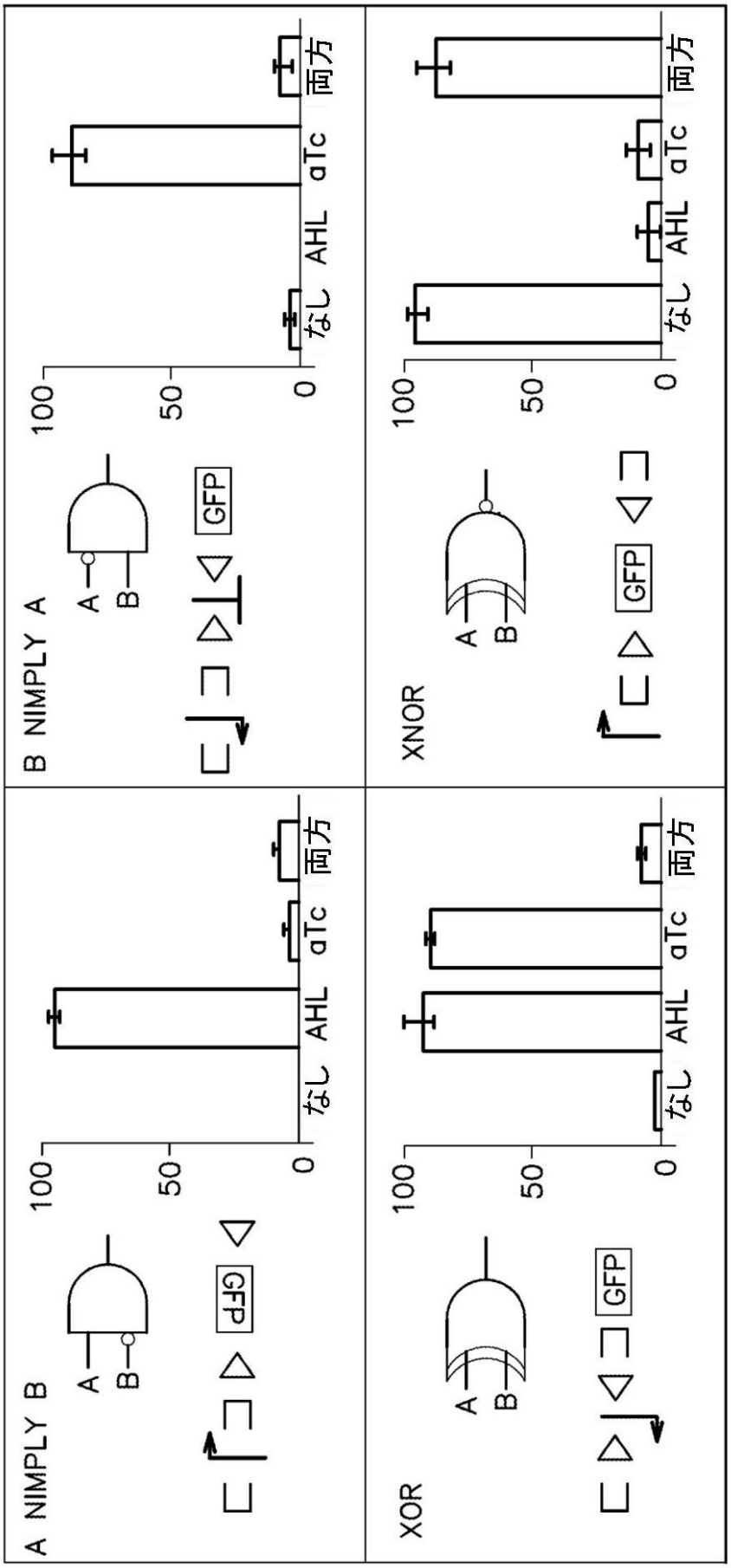


図2-4

【図３】

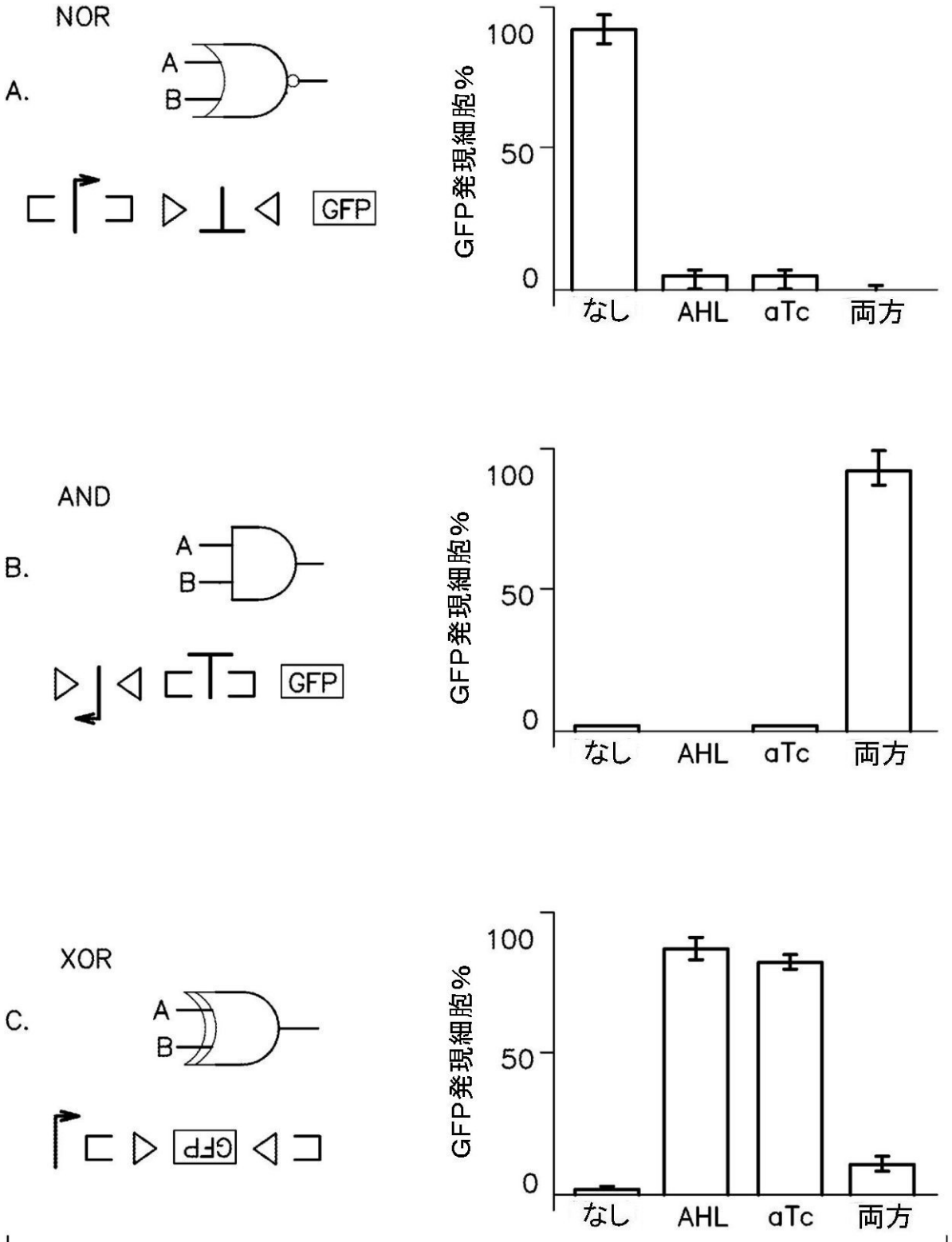

NOR
A.
A
B
GFP
GFP発現細胞%
100
50
0
なし
AHL
aTc
両方
AND
B.
A
B
GFP
GFP発現細胞%
100
50
0
なし
AHL
aTc
両方
XOR
C.
A
B
GFP
GFP発現細胞%
100
50
0
なし
AHL
aTc
両方

図3

【図４Ａ】

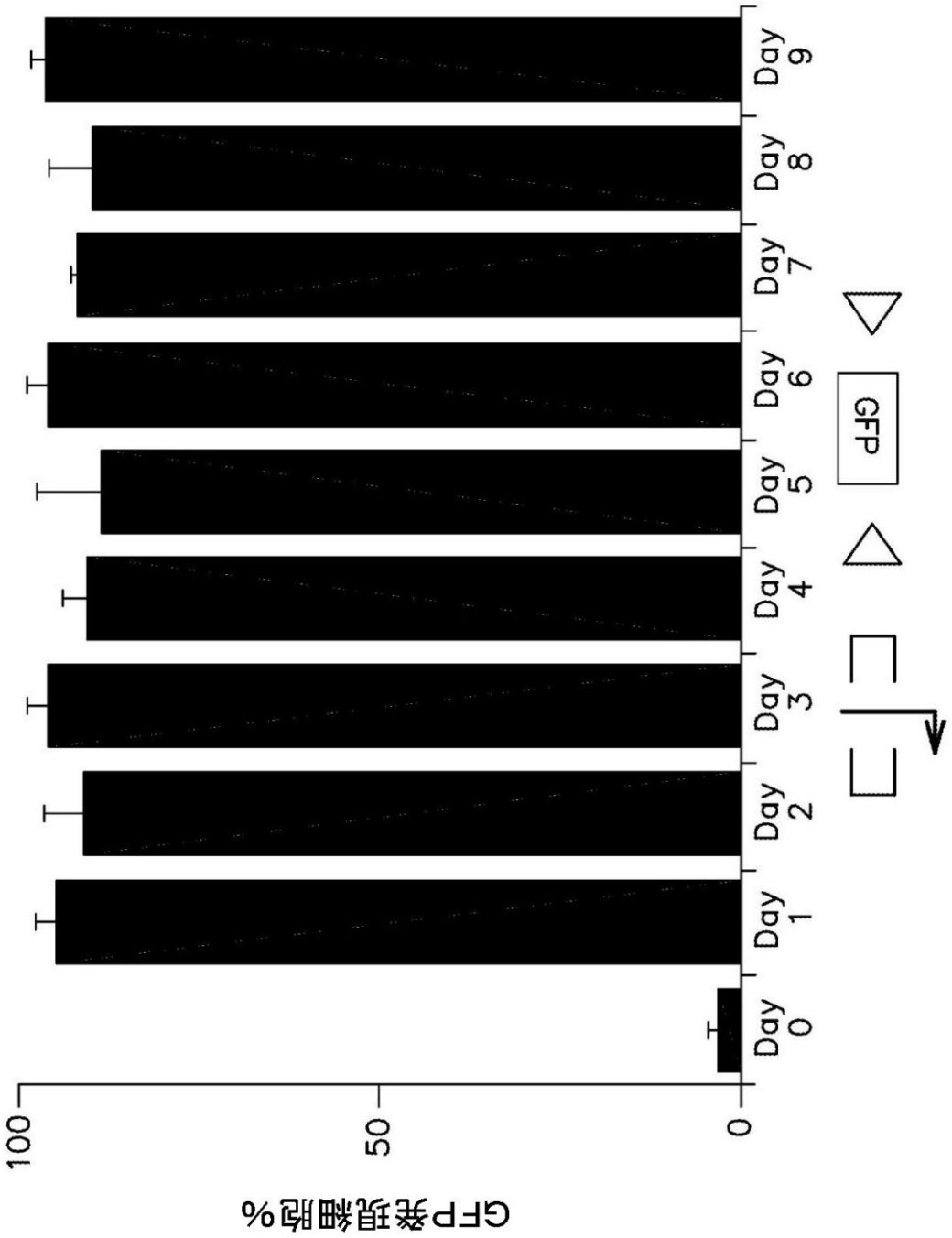

GFP発現細胞%
100
50
0
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day 8
Day 9
GFP

図4A

【図４Ｂ】

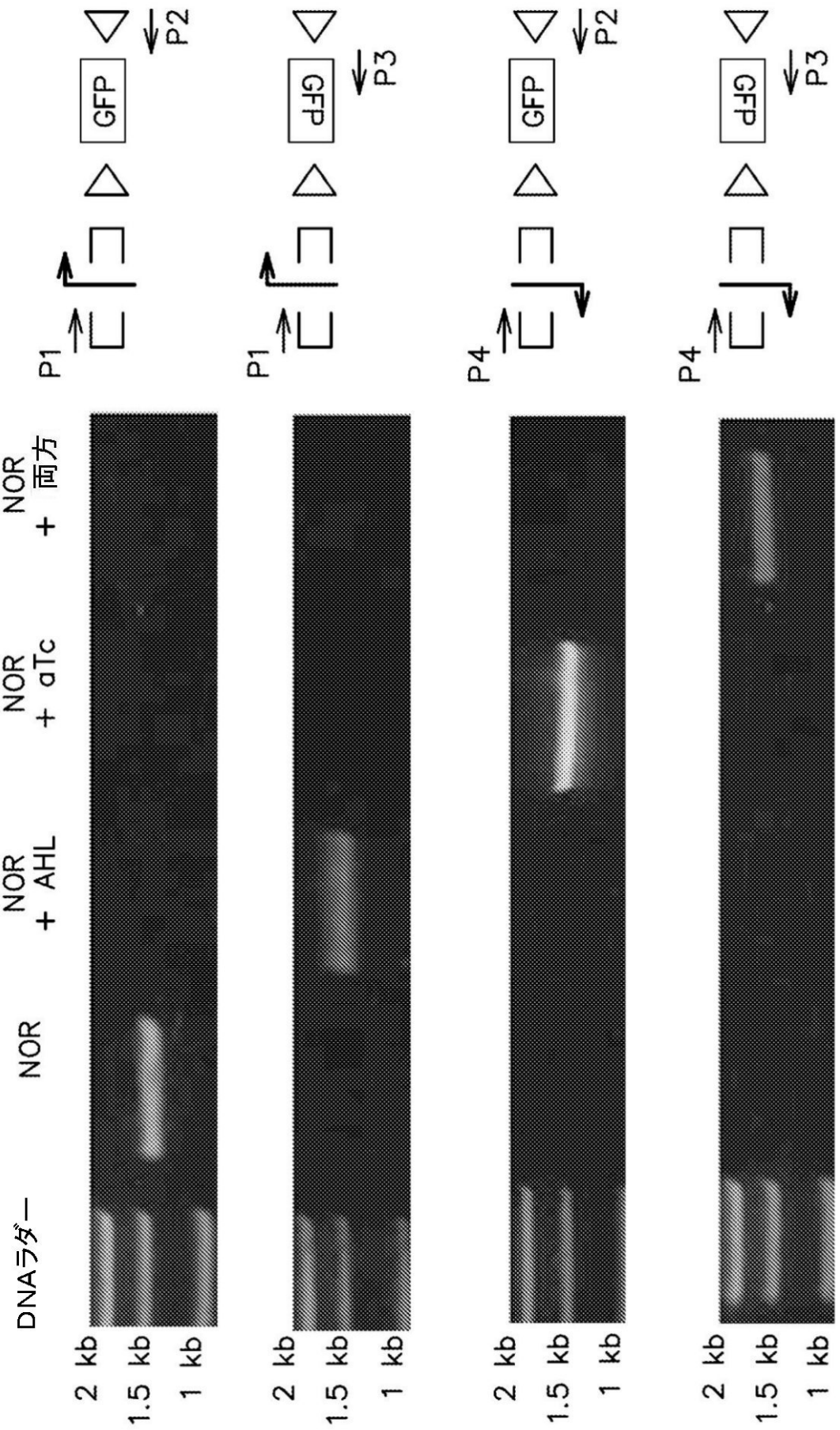


図 4B

【図５ＡＢ】

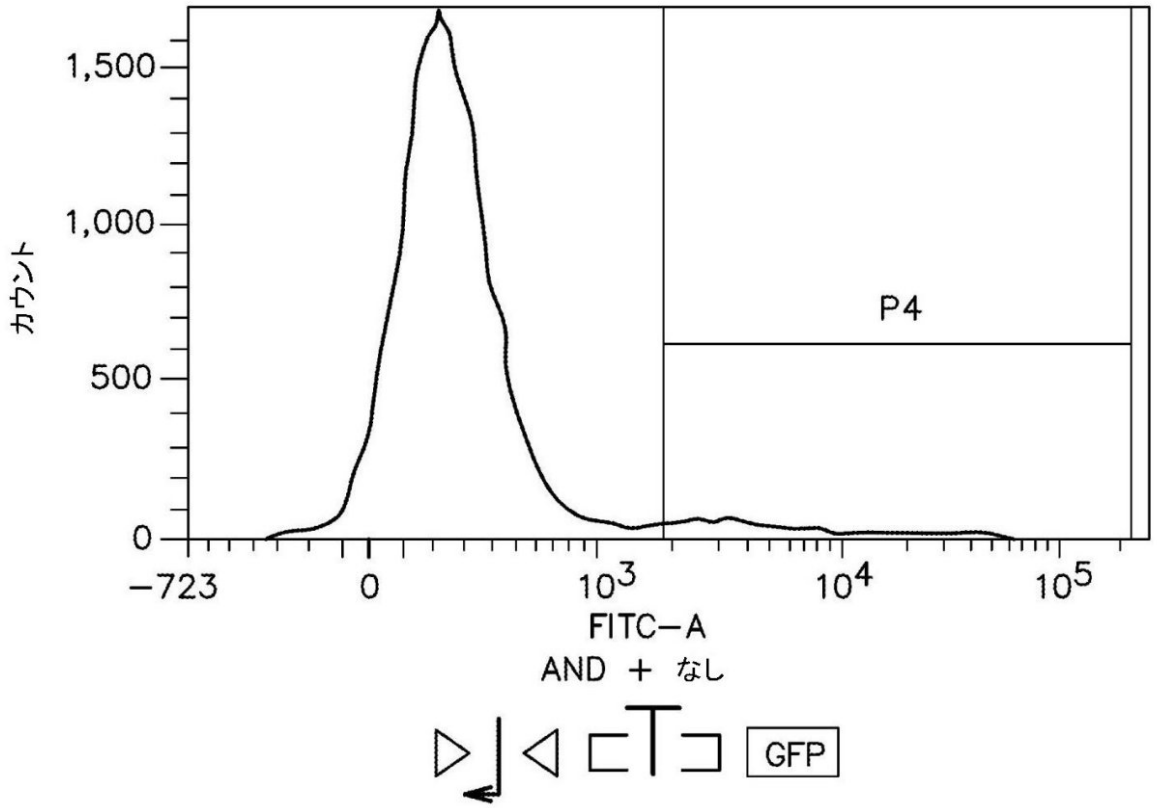

1,500
1,000
500
0
カウント
P4
−723
0
10^3
10^4
10^5
FITC−A
AND + なし
GFP

図 5A

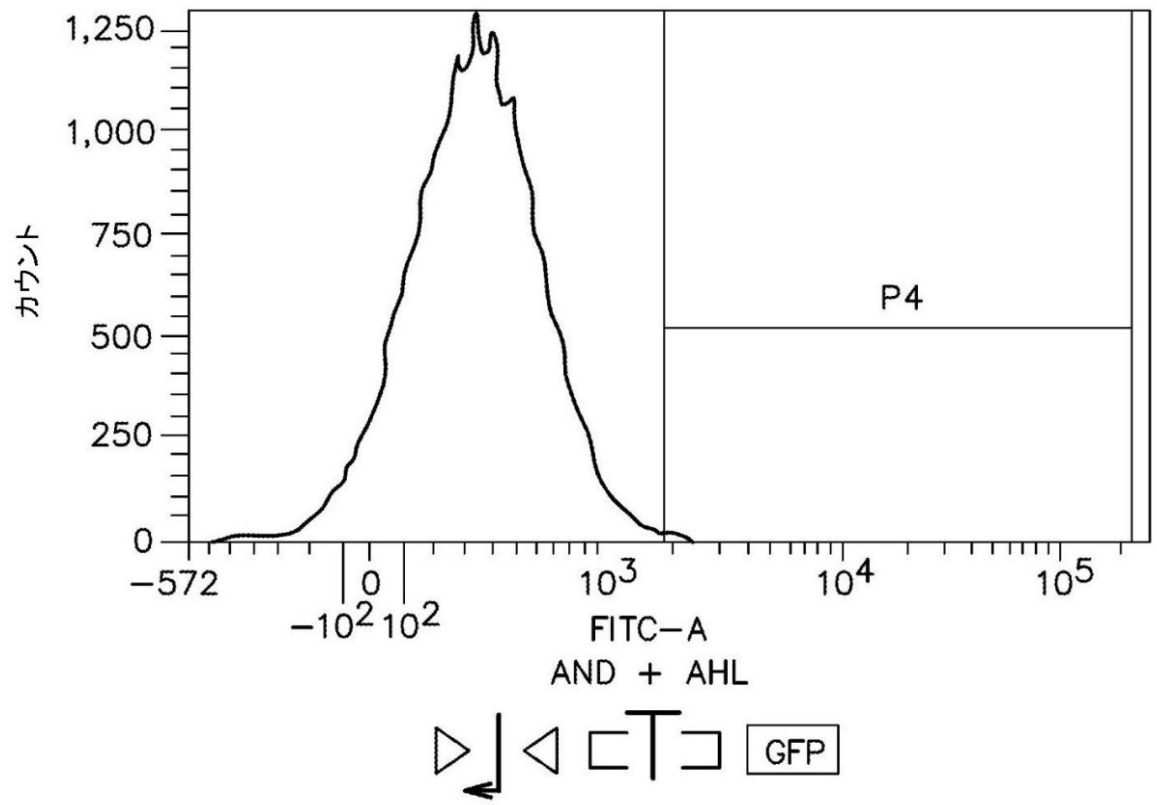

1,250
1,000
750
500
250
0
カウント
P4
−572
0
−10^2 10^2
10^3
10^4
10^5
FITC−A
AND + AHL
GFP

図 5B

【図５ＣＤ】

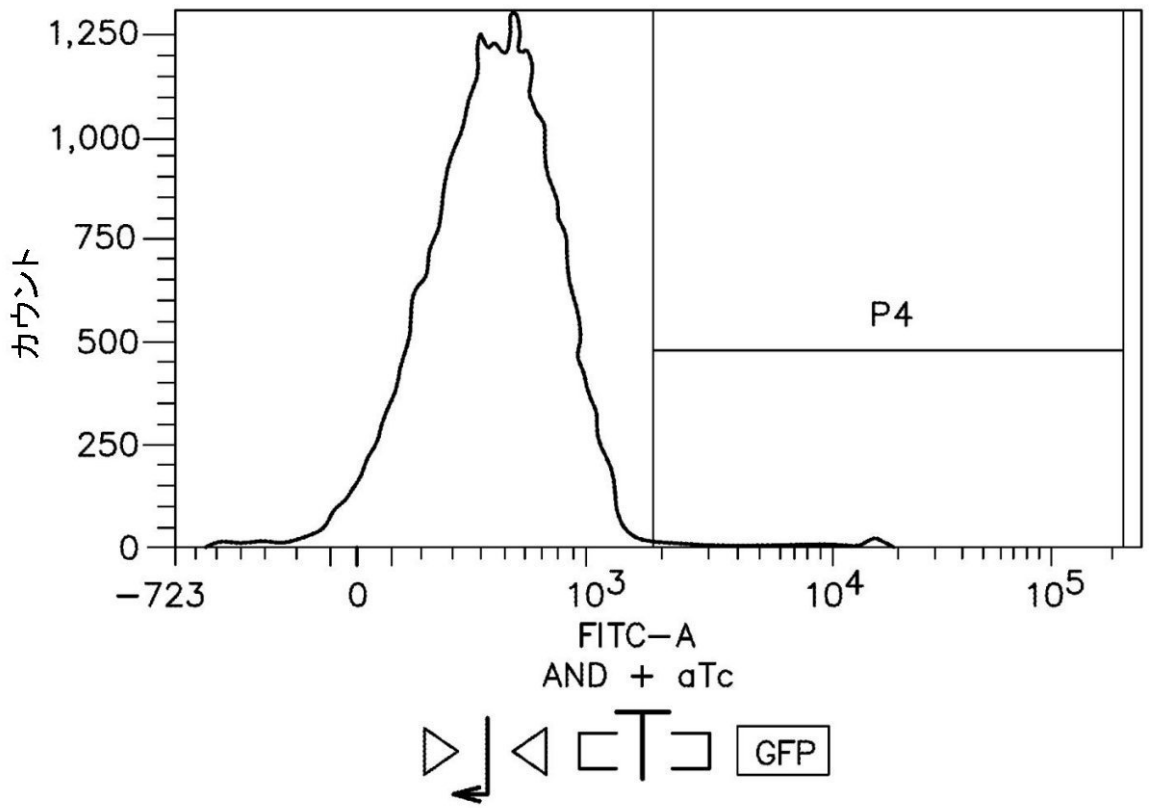

1,250
1,000
750
500
250
0
カウント
P4
−723
0
10^3
10^4
10^5
FITC−A
AND + aTc
GFP

図 5C

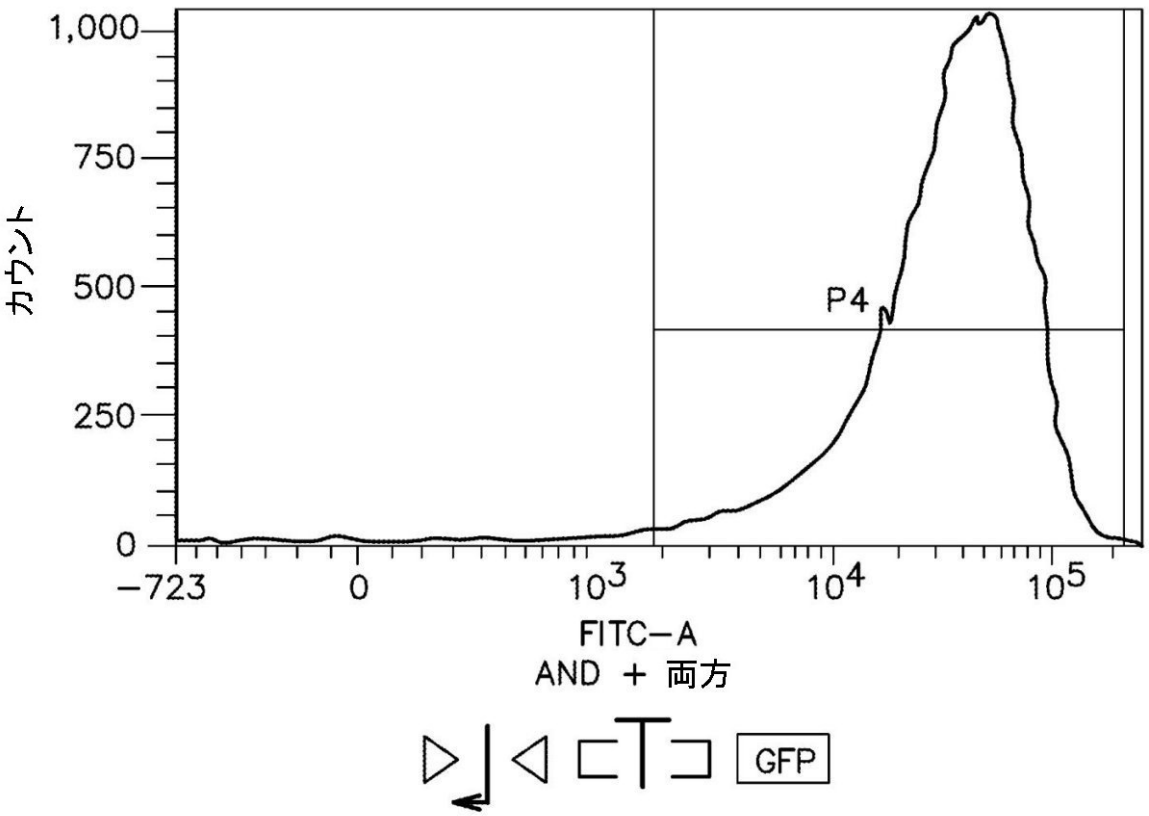

1,000
750
500
250
0
カウント
P4
−723
0
10^3
10^4
10^5
FITC−A
AND + 両方
GFP

図 5D

【図６】

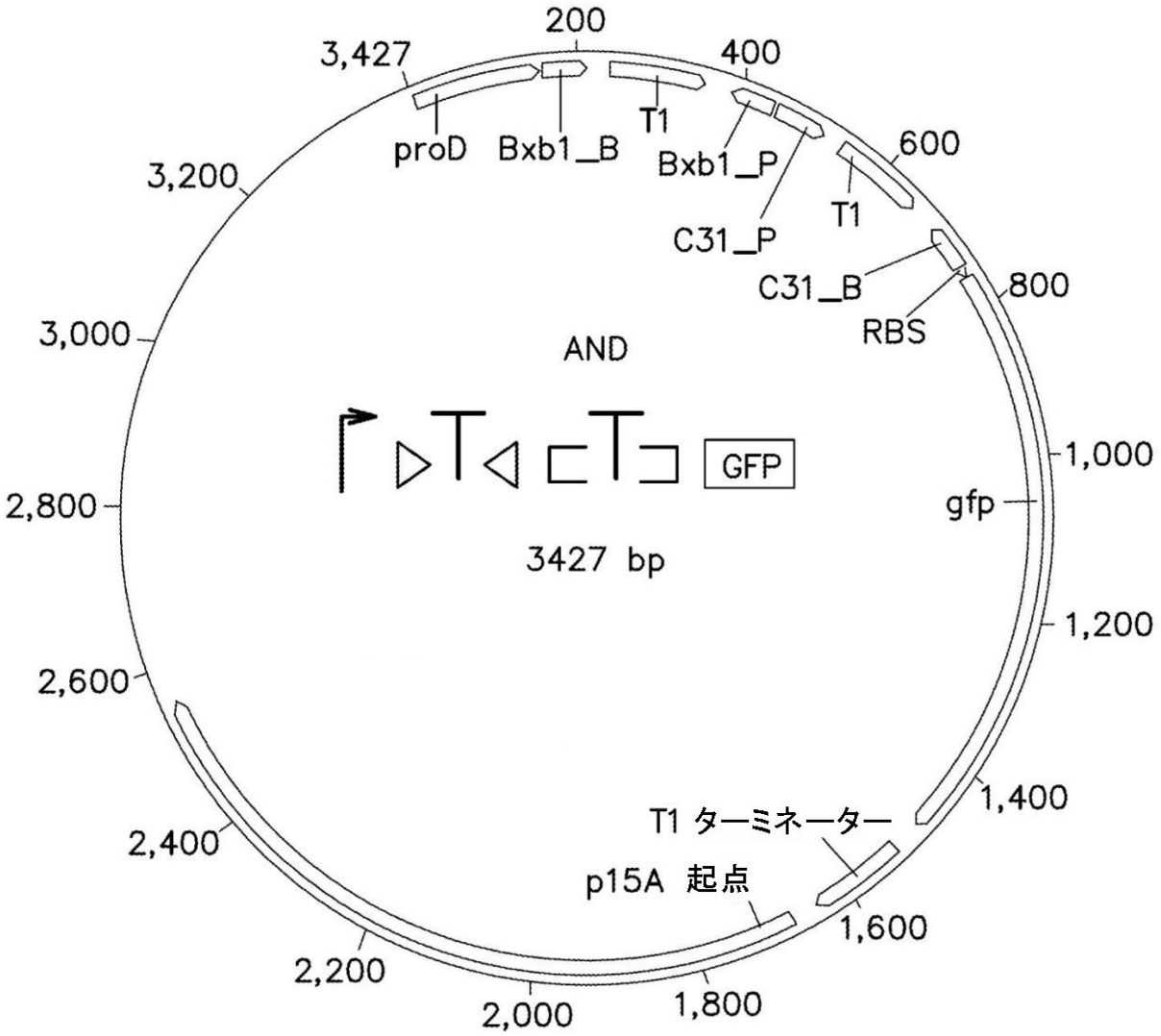

200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
3,200
3,427
proD
Bxb1_B
T1
Bxb1_P
T1
C31_P
C31_B
RBS
AND
GFP
gfp
3427 bp
T1 ターミネーター
p15A 起点

図6

【図７】

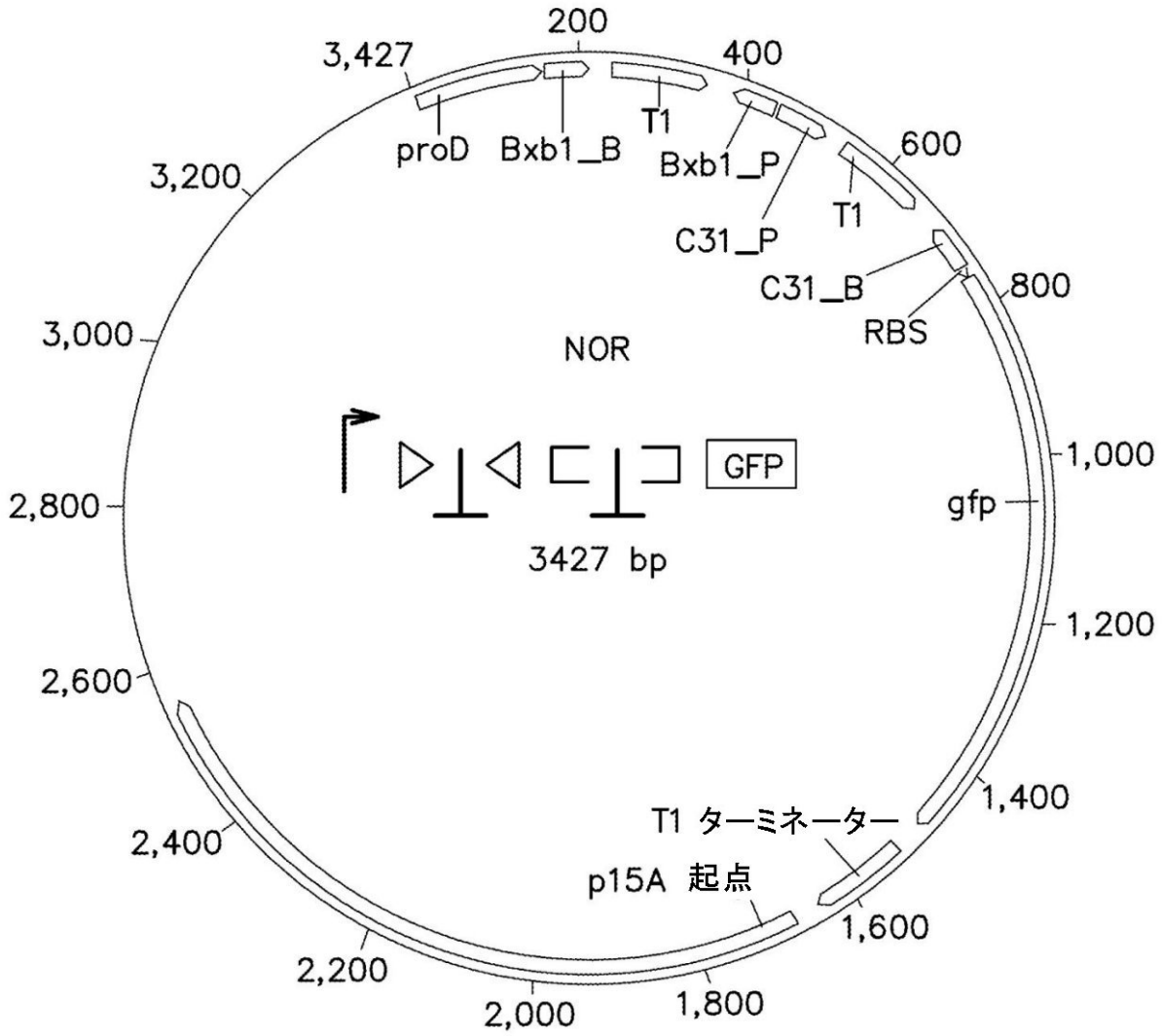

200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
3,200
3,427
proD
Bxb1_B
T1
Bxb1_P
T1
C31_P
C31_B
RBS
NOR
GFP
gfp
3427 bp
T1 ターミネーター
p15A 起点

図７

【図８】

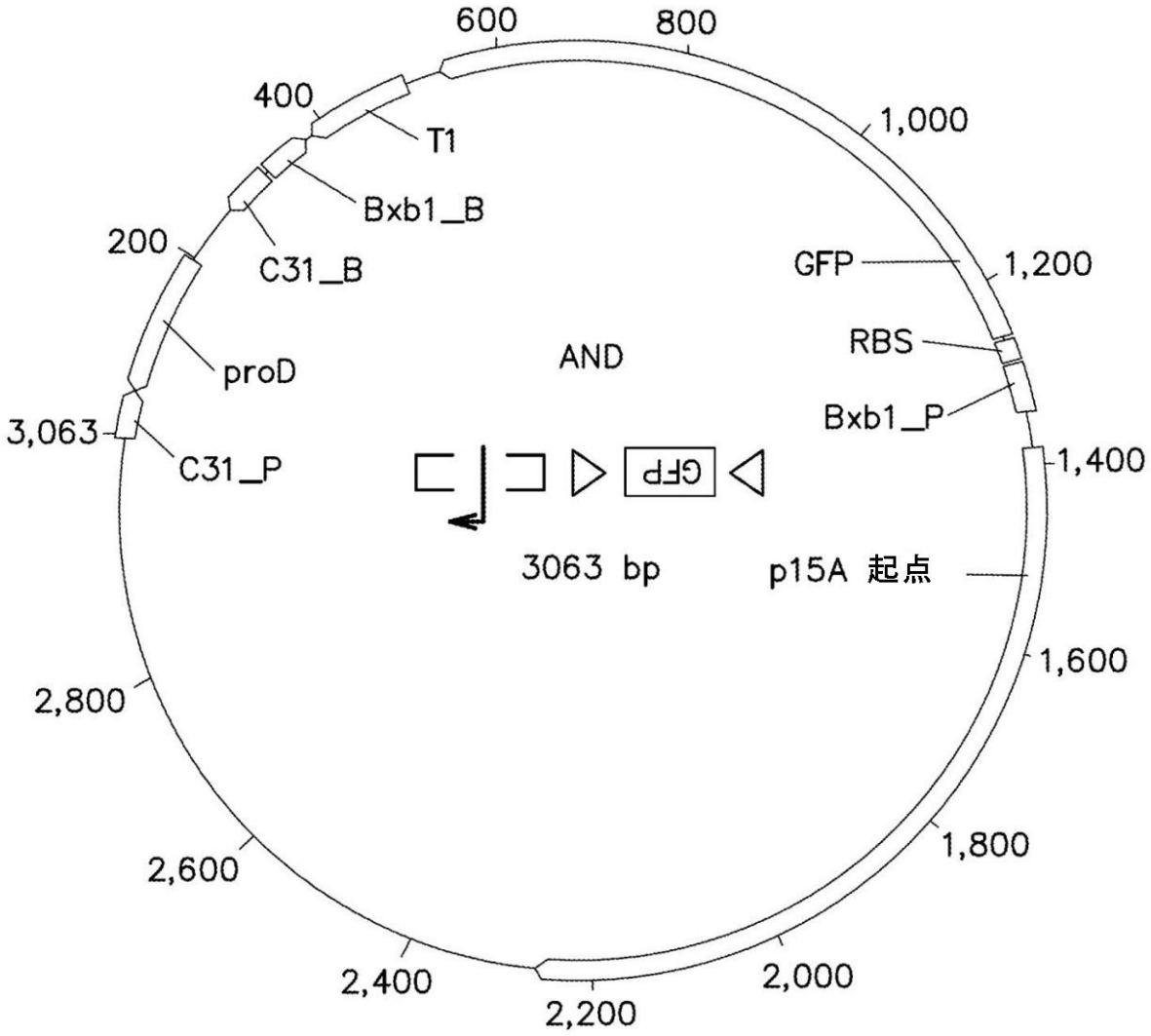

600
800
400
T1
1,000
Bxb1_B
200
C31_B
GFP
1,200
RBS
AND
proD
Bxb1_P
3,063
C31_P
1,400
GFP
3063 bp
p15A 起点
1,600
2,800
1,800
2,600
2,400
2,000
2,200

図8

【図９】

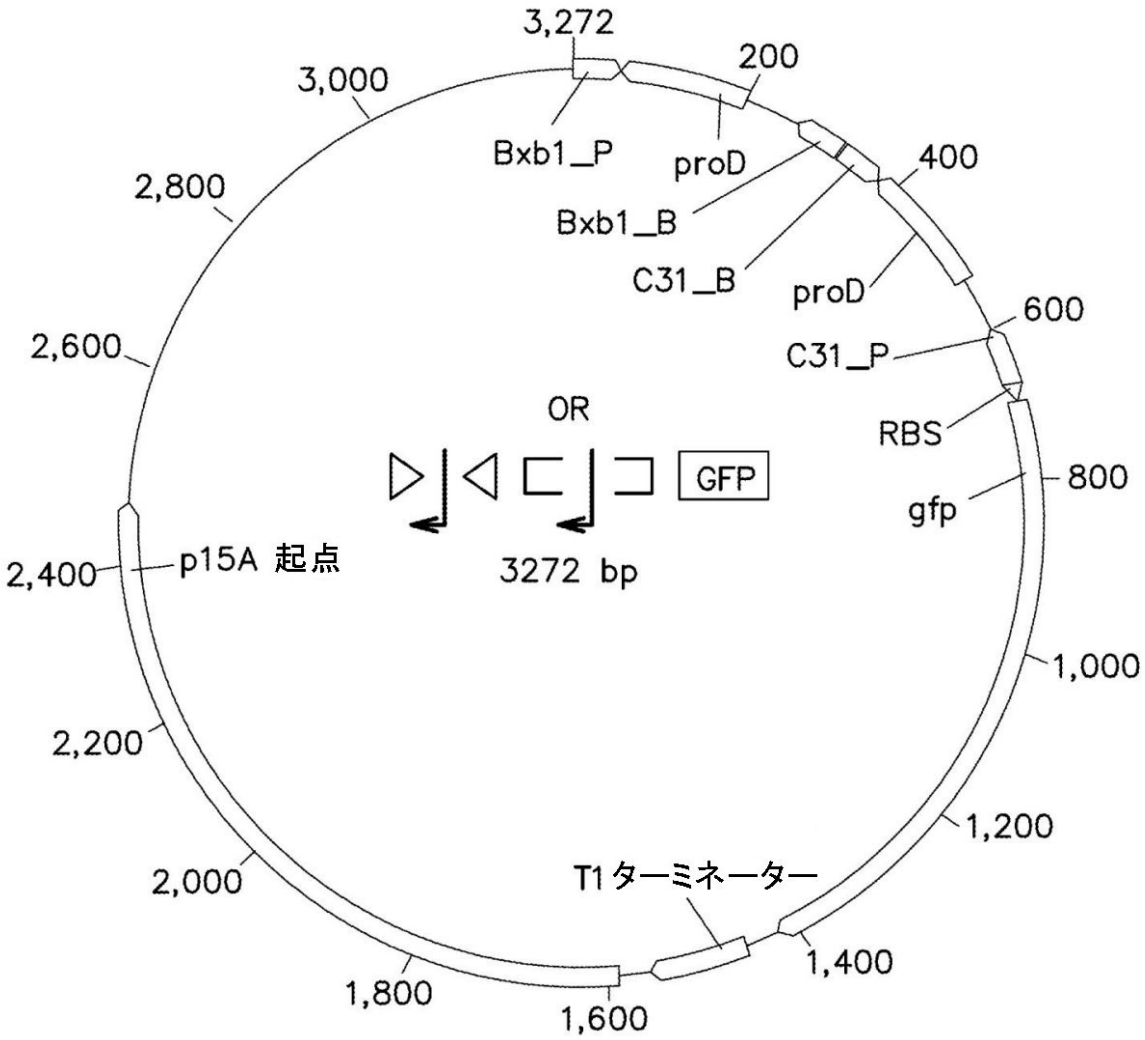

3,272
200
3,000
Bxb1_P
proD
400
2,800
Bxb1_B
C31_B
proD
600
2,600
C31_P
OR
RBS
GFP
800
gfp
2,400
p15A 起点
3272 bp
1,000
2,200
1,200
2,000
T1ターミネーター
1,400
1,800
1,600

図 9

【図１０】

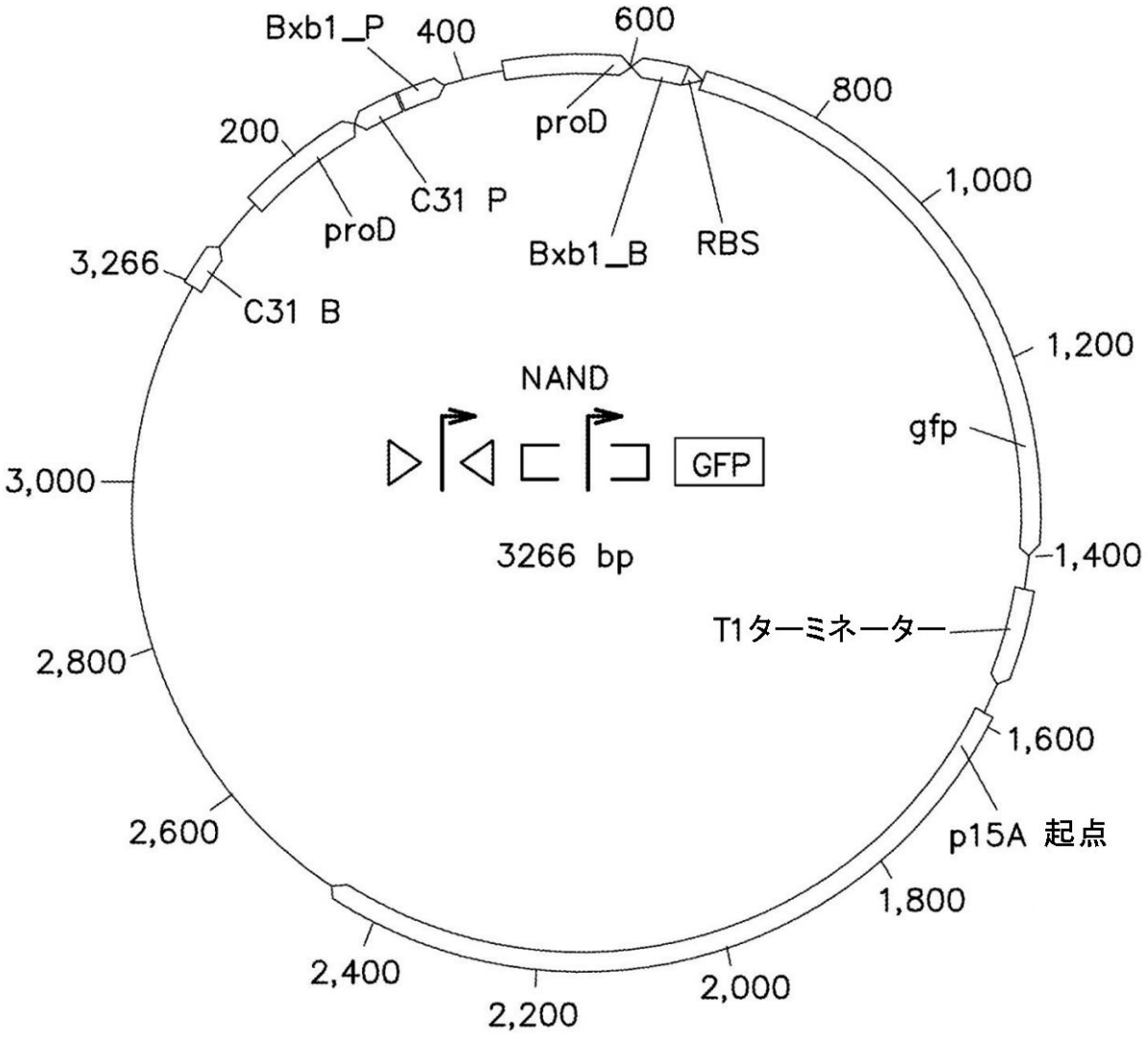

Bxb1_P
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
3,266
200
proD
C31 P
proD
Bxb1_B
RBS
C31 B
NAND
GFP
3266 bp
gfp
T1ターミネーター
p15A 起点

図 10

【図１１】

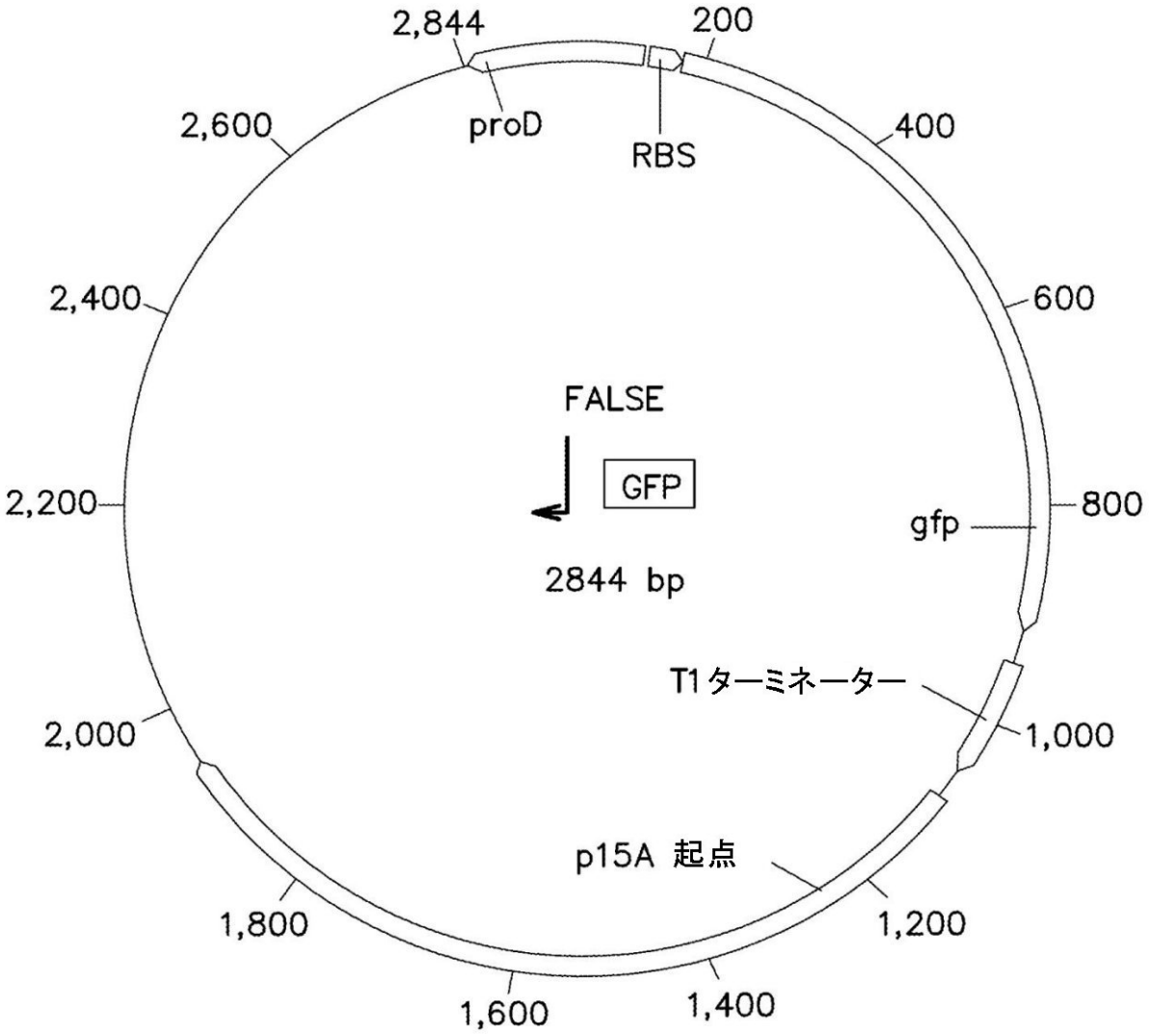

2,844
200
2,600
proD
RBS
400
2,400
600
FALSE
GFP
2,200
gfp
800
2844 bp
T1ターミネーター
2,000
1,000
p15A 起点
1,800
1,200
1,600
1,400

図 11

【図１２】

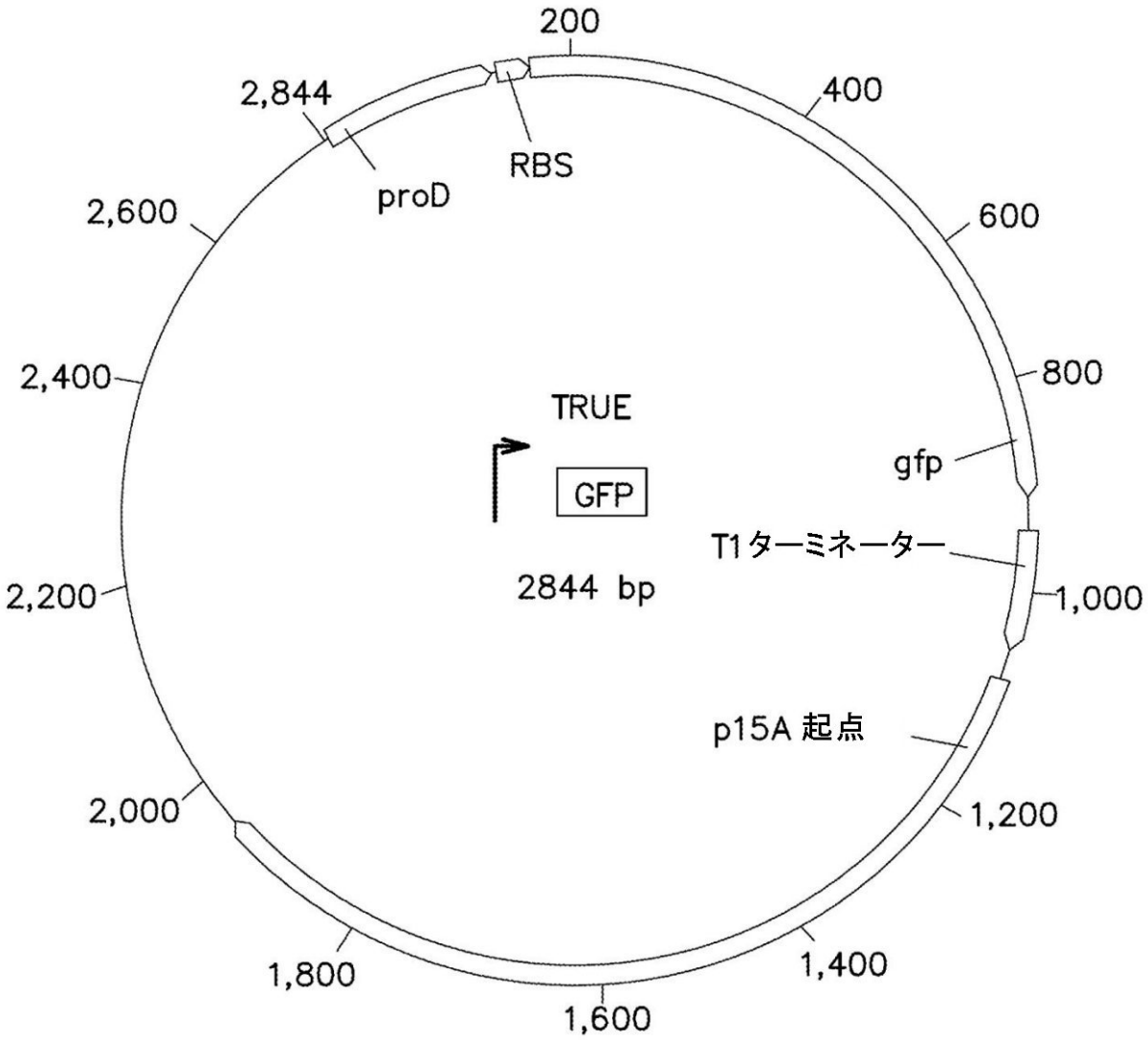

200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,844
RBS
proD
gfp
T1ターミネーター
p15A 起点
TRUE
GFP
2844 bp

図12

【図１３】

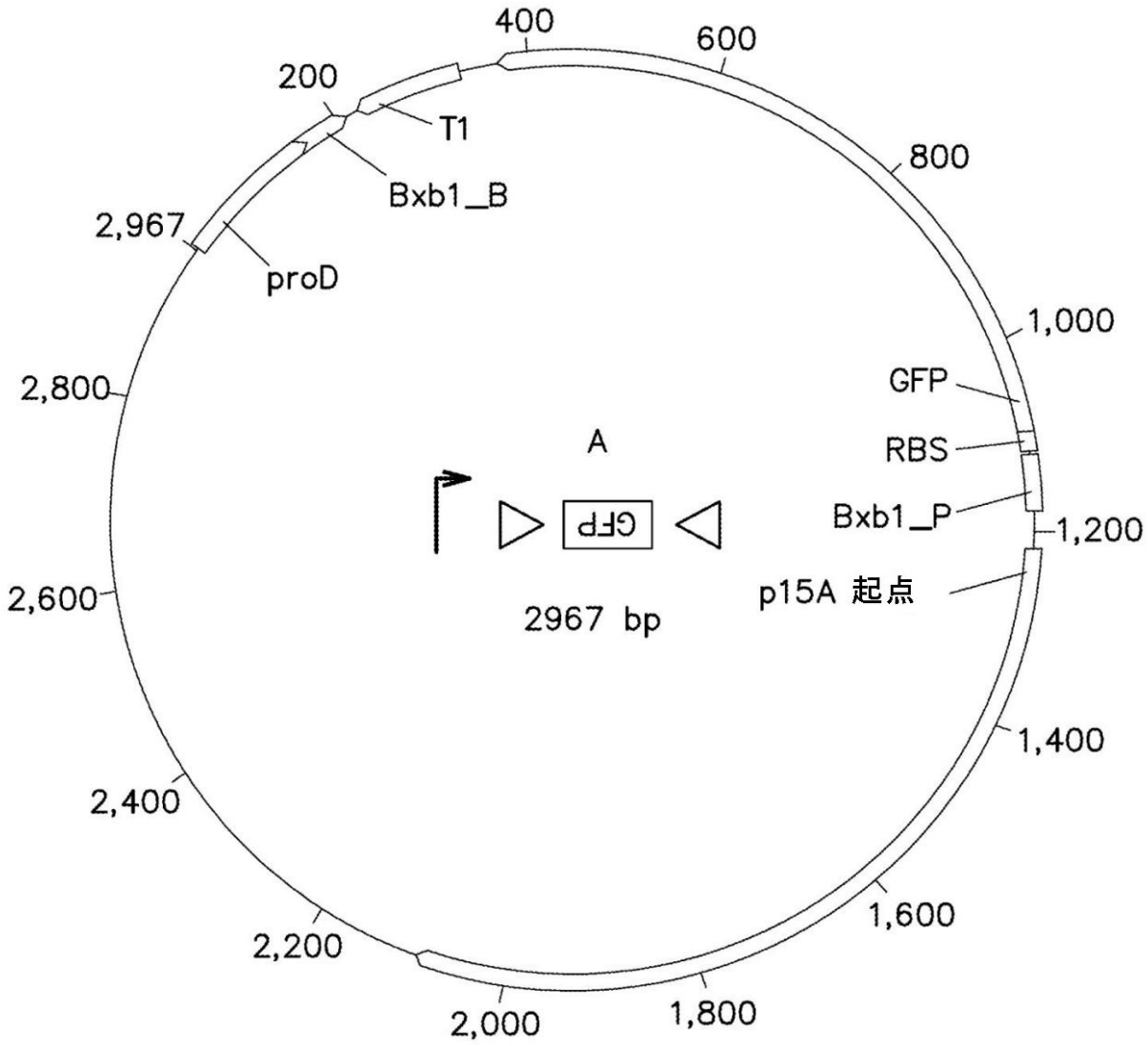

400
600
200
T1
800
Bxb1_B
2,967
proD
1,000
GFP
2,800
A
RBS
GFP
Bxb1_P
1,200
2,600
2967 bp
p15A 起点
1,400
2,400
1,600
2,200
2,000
1,800

図 13

【図１４】

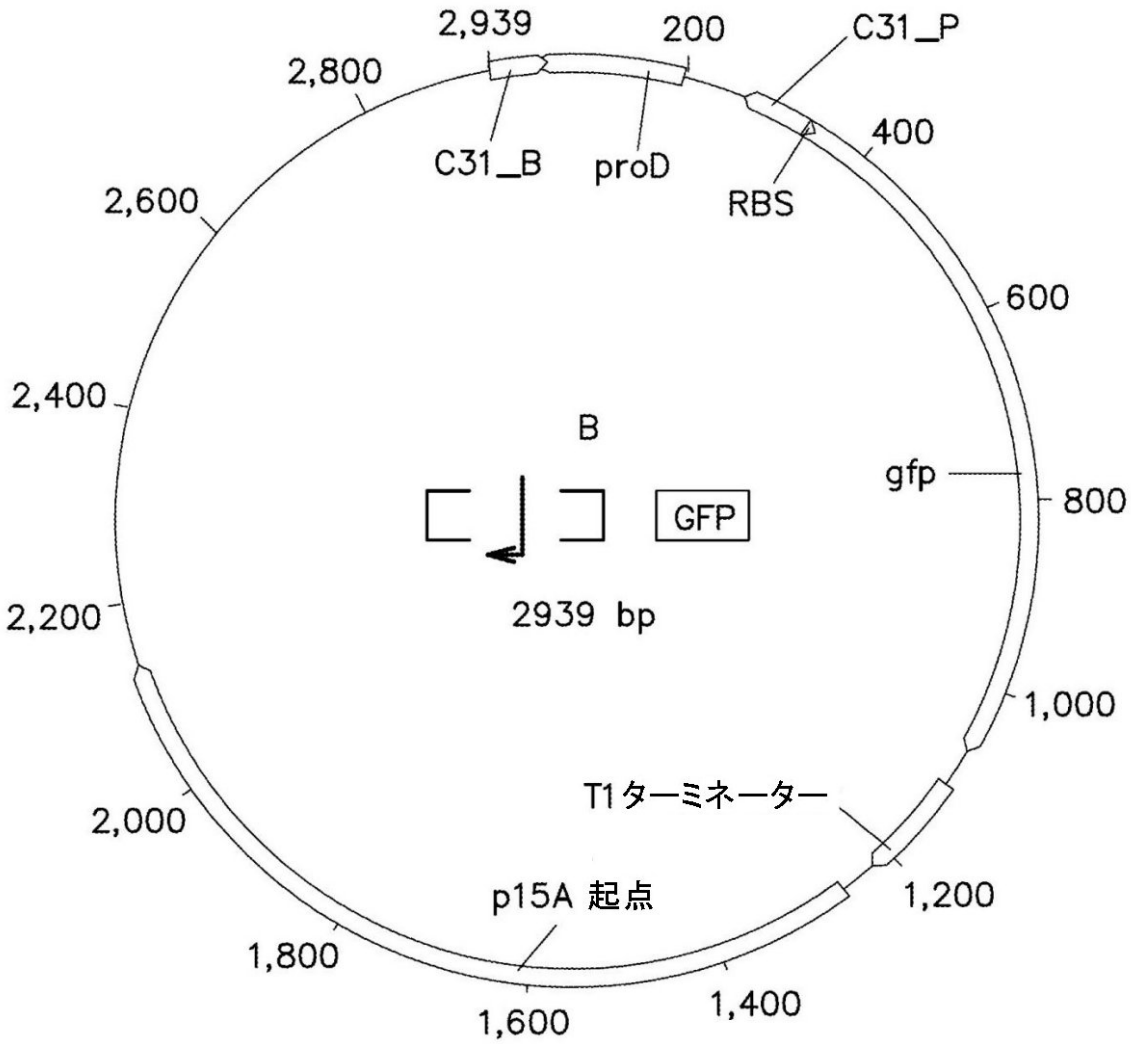

2,939
200
C31_P
2,800
400
C31_B
proD
RBS
2,600
600
2,400
B
gfp
800
GFP
2,200
2939 bp
1,000
T1ターミネーター
2,000
1,200
p15A 起点
1,800
1,400
1,600

図 14

【図１５】

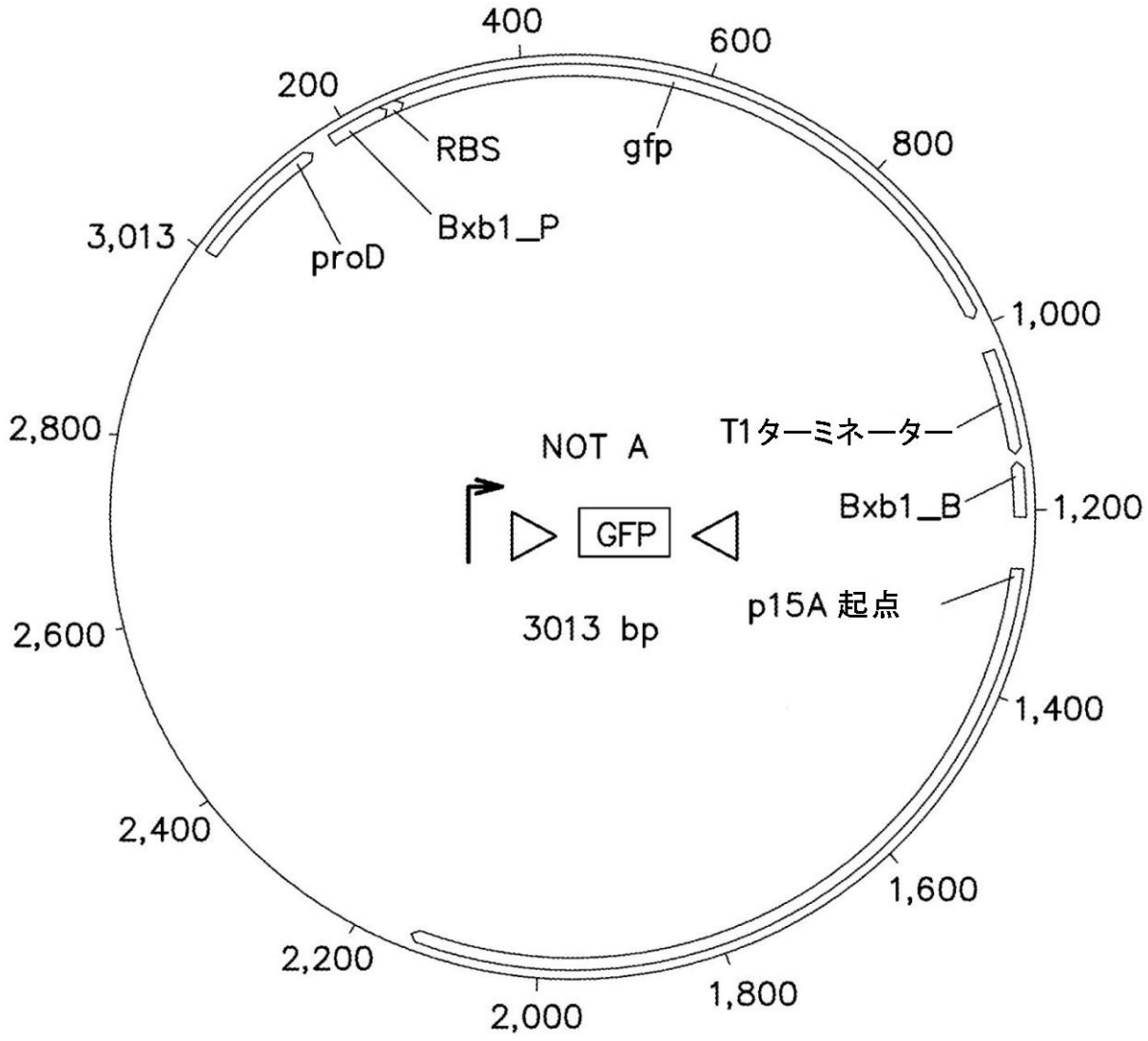

400
600
200
800
RBS
gfp
Bxb1_P
3,013
proD
1,000
T1ターミネーター
2,800
NOT A
Bxb1_B
1,200
GFP
p15A 起点
3013 bp
2,600
1,400
2,400
1,600
2,200
1,800
2,000

図 15

【図１６】

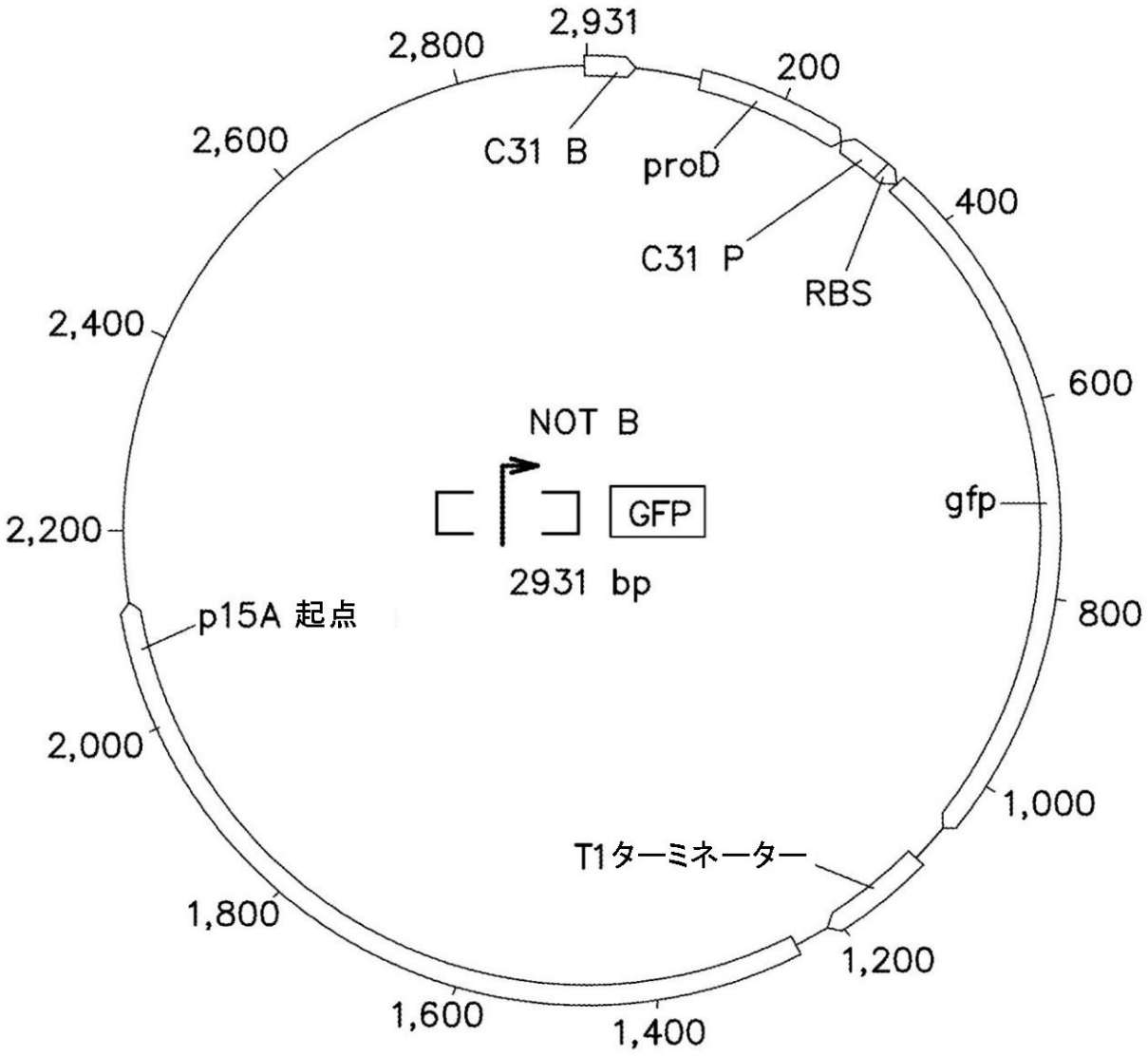

2,931
200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
C31 B
proD
C31 P
RBS
NOT B
GFP
gfp
2931 bp
p15A 起点
T1ターミネーター

図16

【図１７】

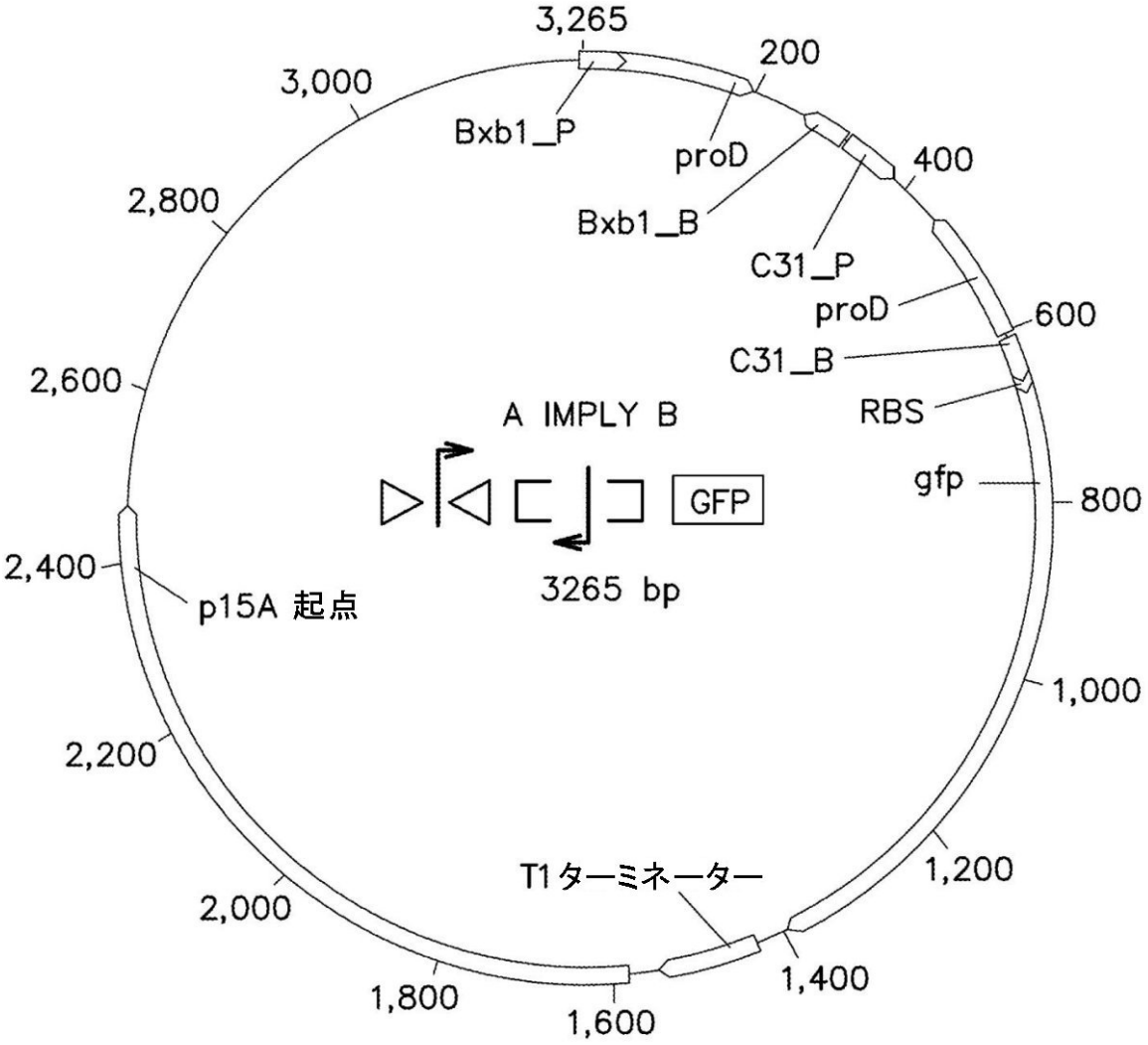

3,265
200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
Bxb1_P
proD
Bxb1_B
C31_P
proD
C31_B
RBS
gfp
A IMPLY B
GFP
3265 bp
p15A 起点
T1ターミネーター

図 17

【図１８】

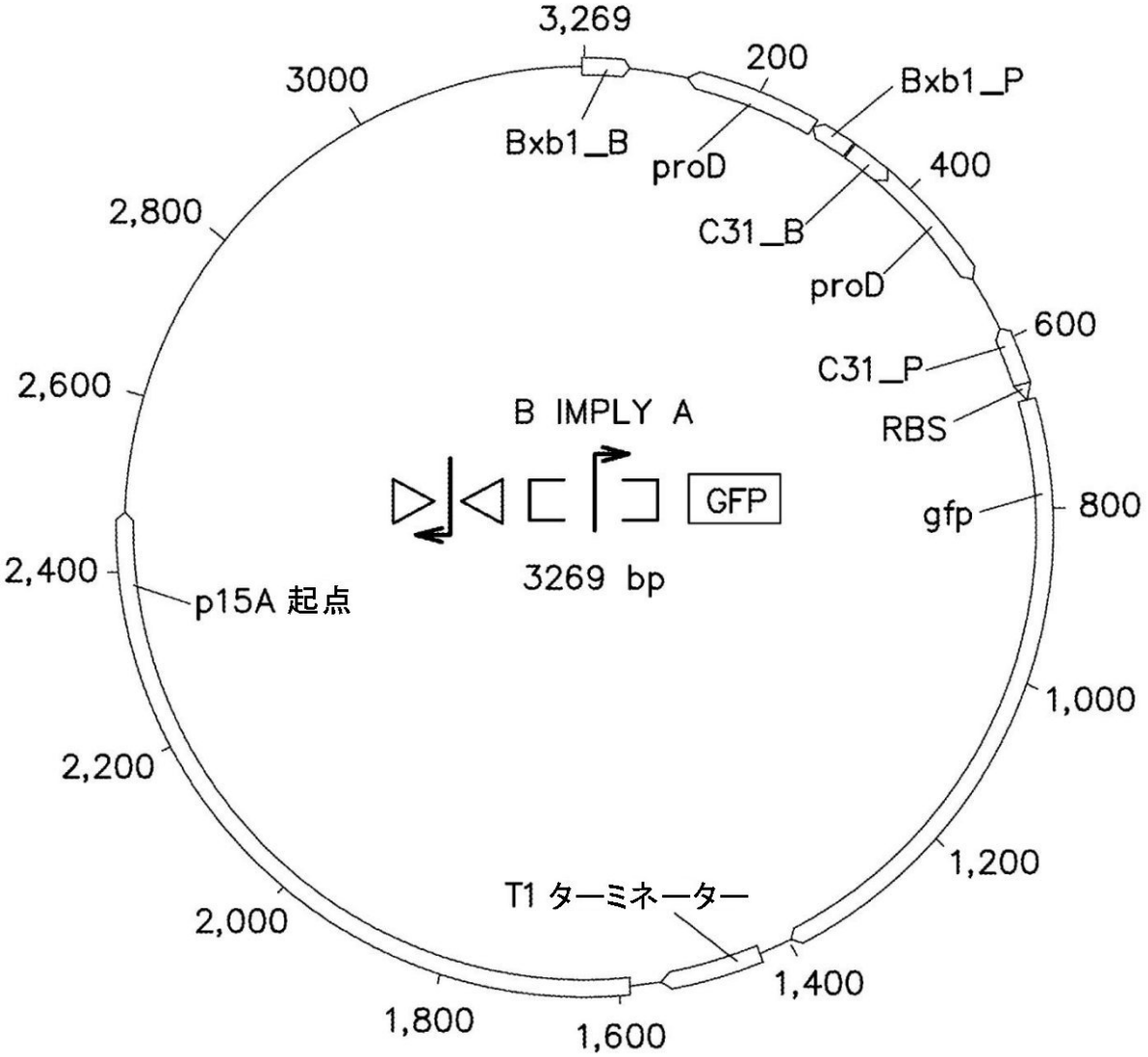

3,269
200
Bxb1_P
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3000
Bxb1_B
proD
C31_B
proD
C31_P
RBS
gfp
B IMPLY A
GFP
3269 bp
p15A 起点
T1 ターミネーター

図18

【図１９】

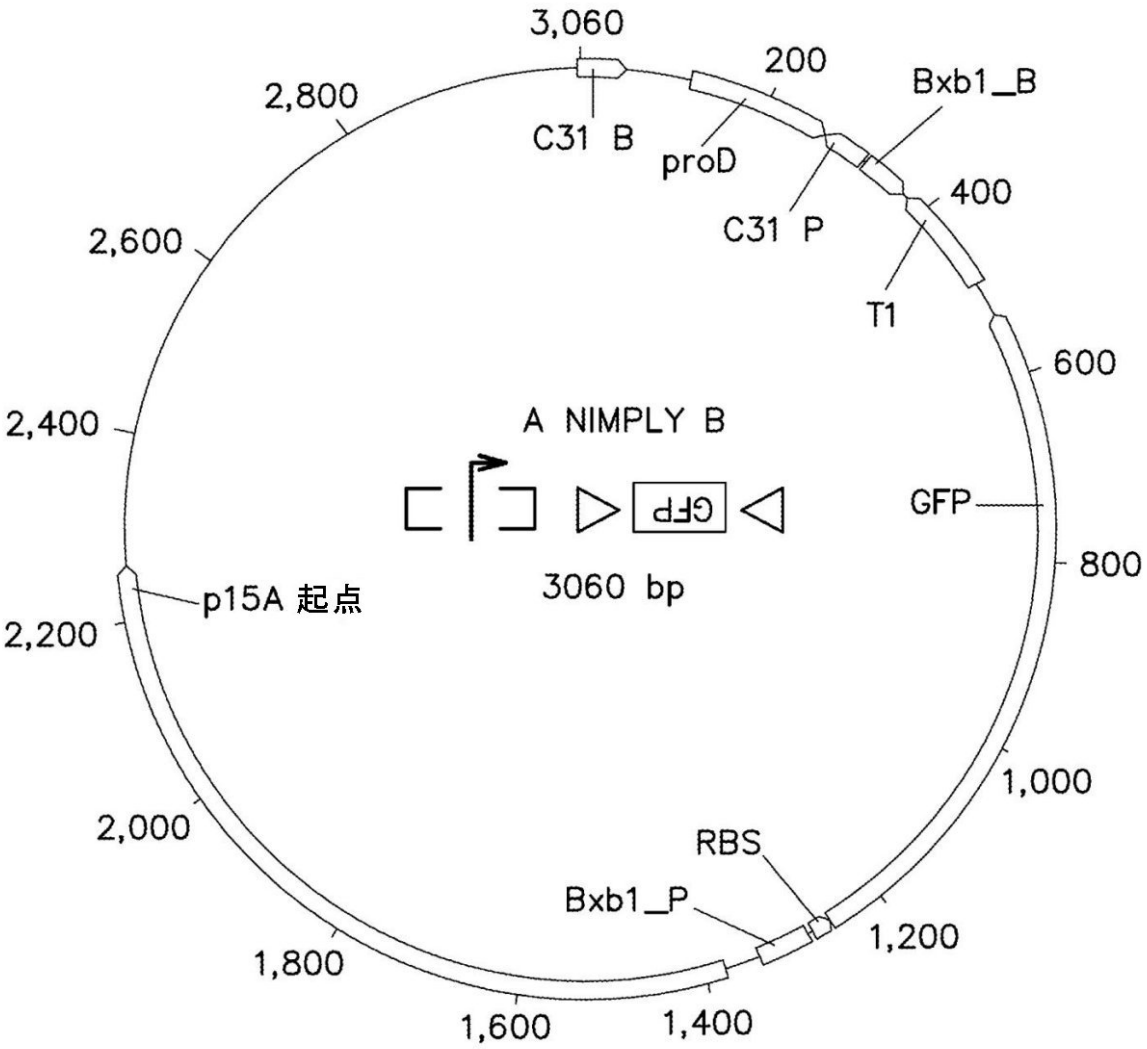

3,060
200
Bxb1_B
2,800
C31 B
proD
400
C31 P
2,600
T1
600
2,400
A NIMPLY B
GFP
GFP
800
p15A 起点
3060 bp
2,200
1,000
2,000
RBS
Bxb1_P
1,200
1,800
1,600
1,400

図 19

【図２０】

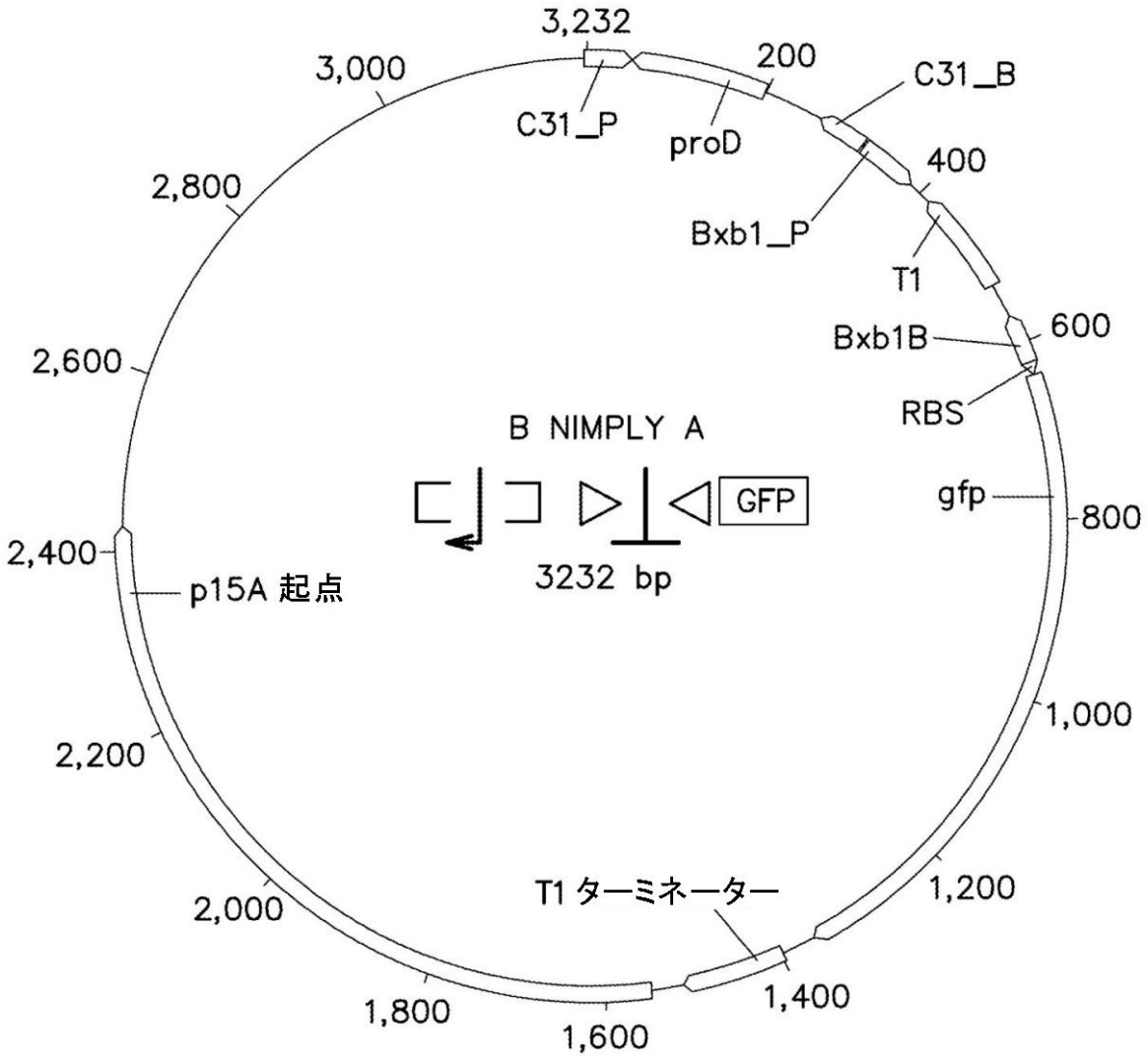

3,232
200
C31_B
400
T1
600
RBS
gfp
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
C31_P
proD
Bxb1_P
Bxb1B
B NIMPLY A
GFP
3232 bp
p15A 起点
T1 ターミネーター

図 20

【図２１】

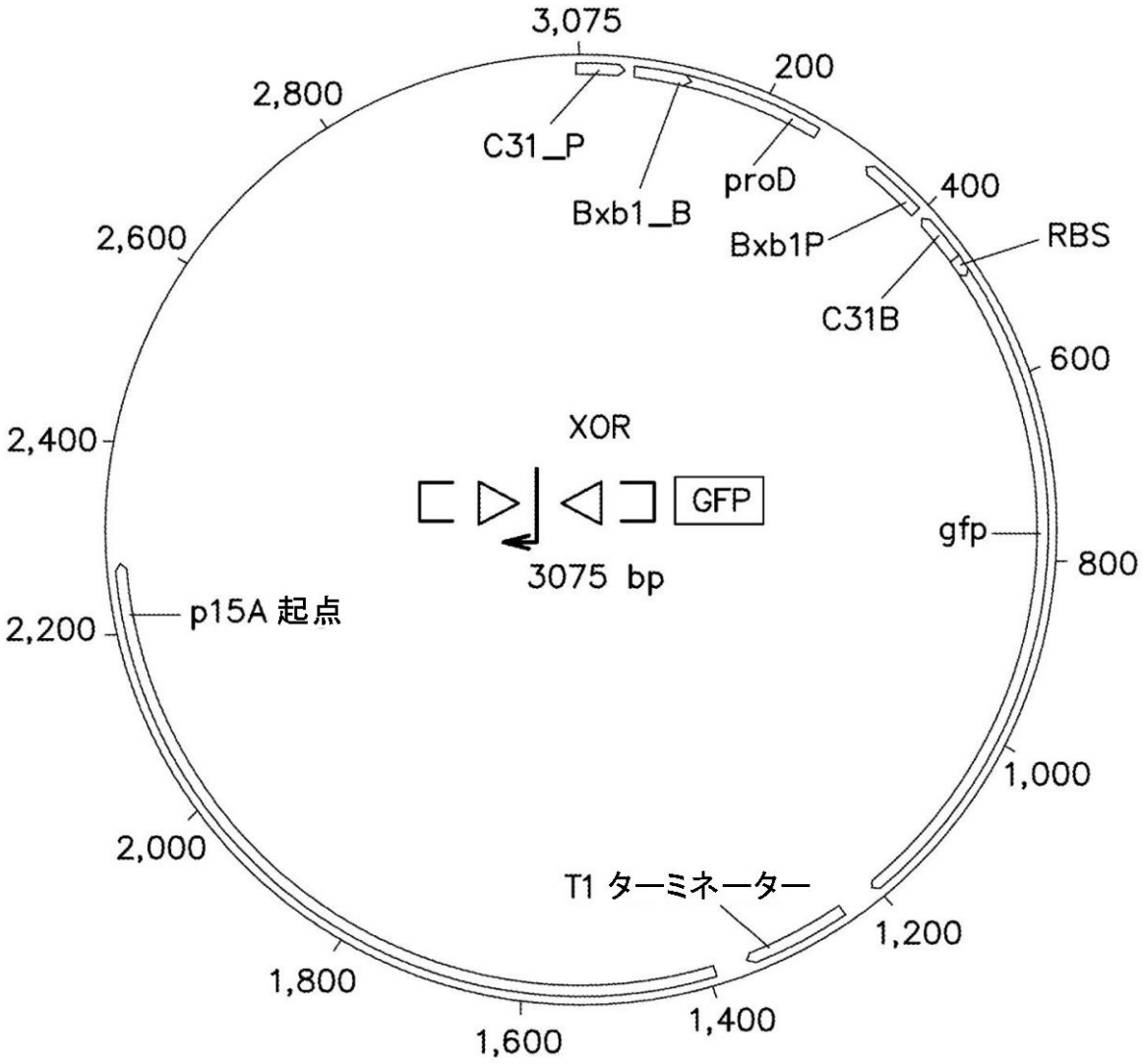

3,075
200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
C31_P
Bxb1_B
proD
Bxb1P
RBS
C31B
XOR
GFP
gfp
3075 bp
p15A 起点
T1 ターミネーター

図 21

【図２２】

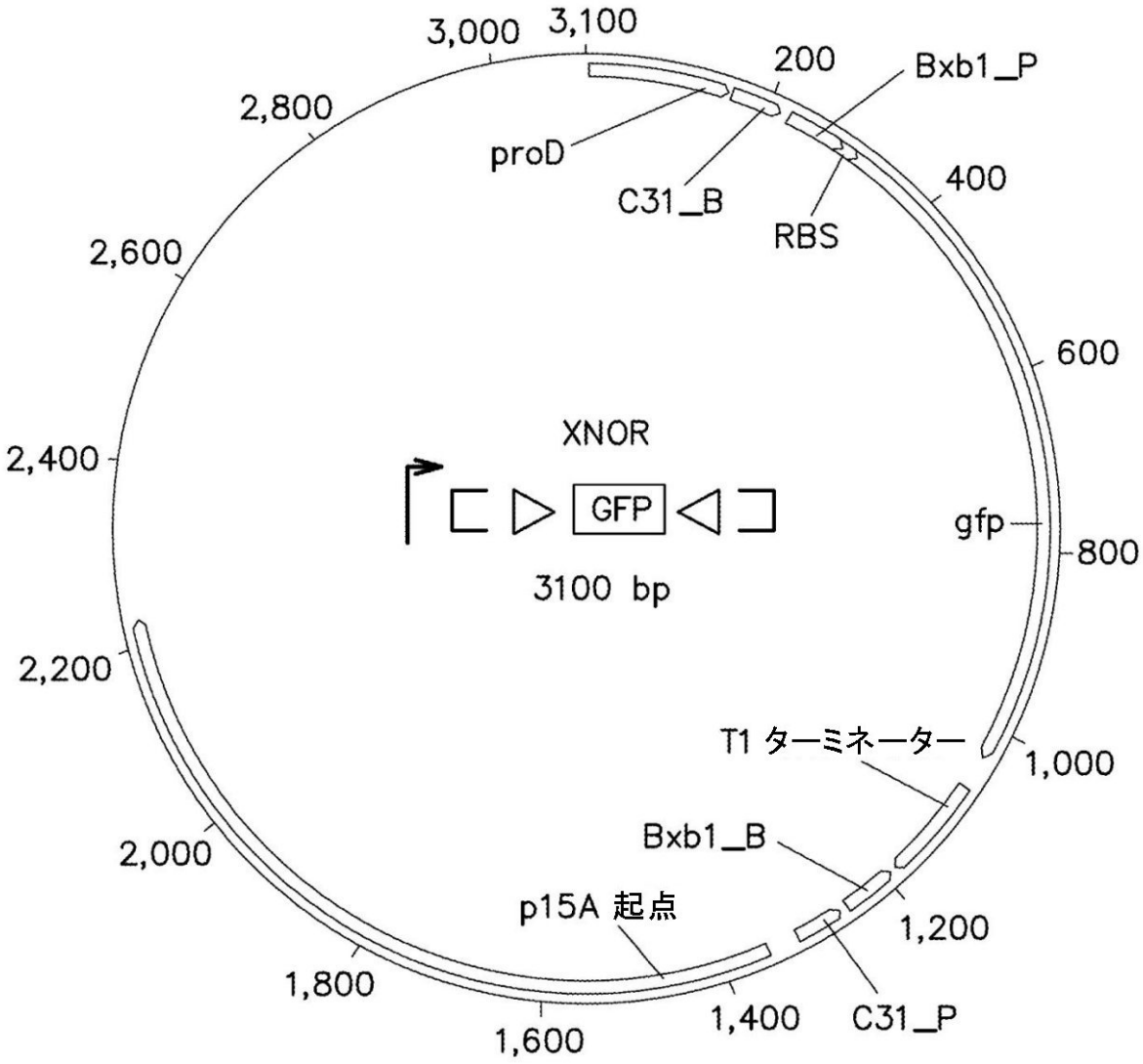

3,000
3,100
200
Bxb1_P
2,800
proD
C31_B
RBS
400
2,600
600
XNOR
2,400
GFP
gfp
800
3100 bp
2,200
T1 ターミネーター
1,000
Bxb1_B
2,000
p15A 起点
1,200
1,800
1,400
C31_P
1,600

図 22

【図２３】

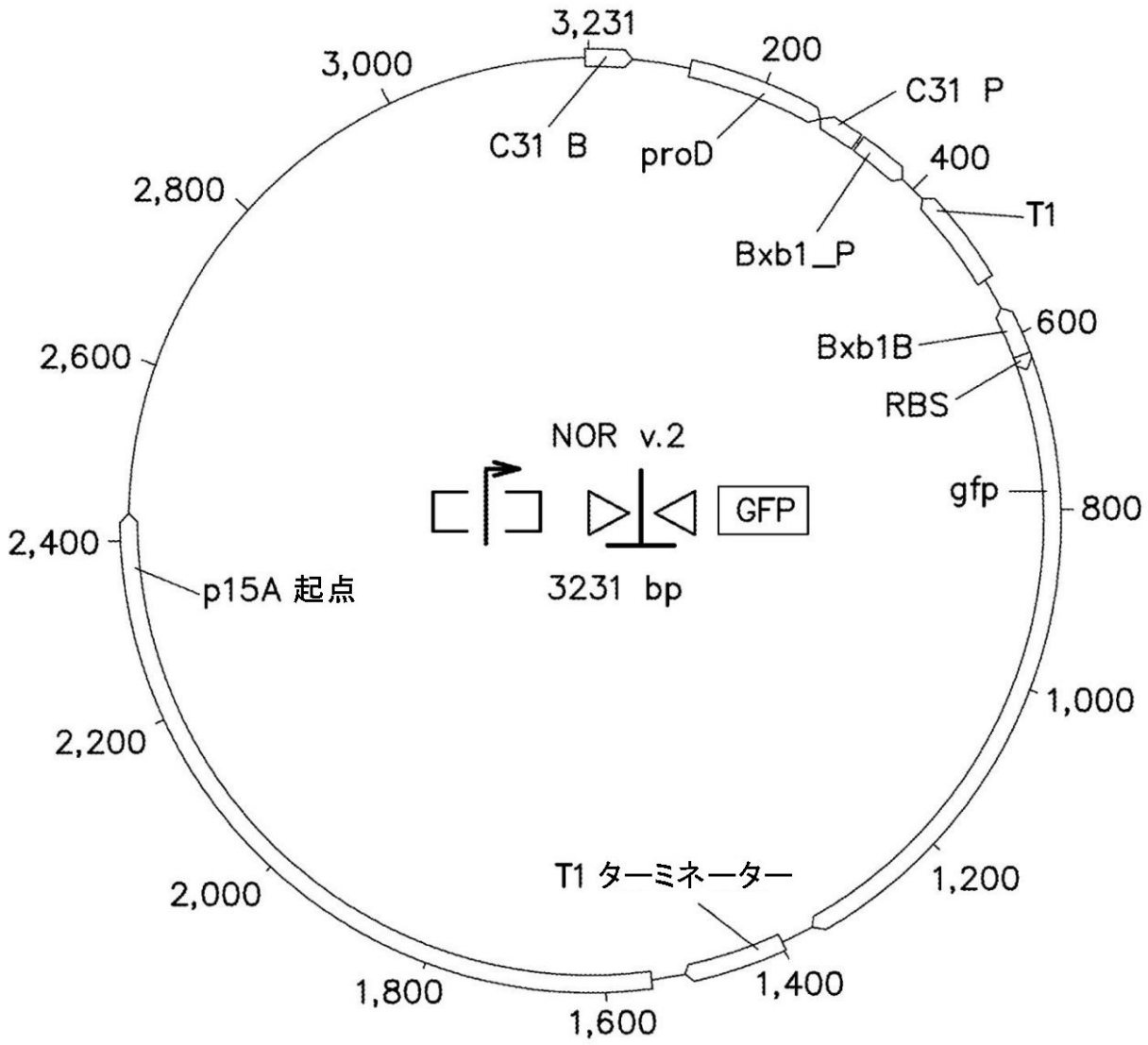

3,231
200
C31 P
400
T1
600
Bxb1B
RBS
gfp
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
C31 B
proD
Bxb1_P
NOR v.2
GFP
3231 bp
p15A 起点
T1 ターミネーター

図 23

【図２４】

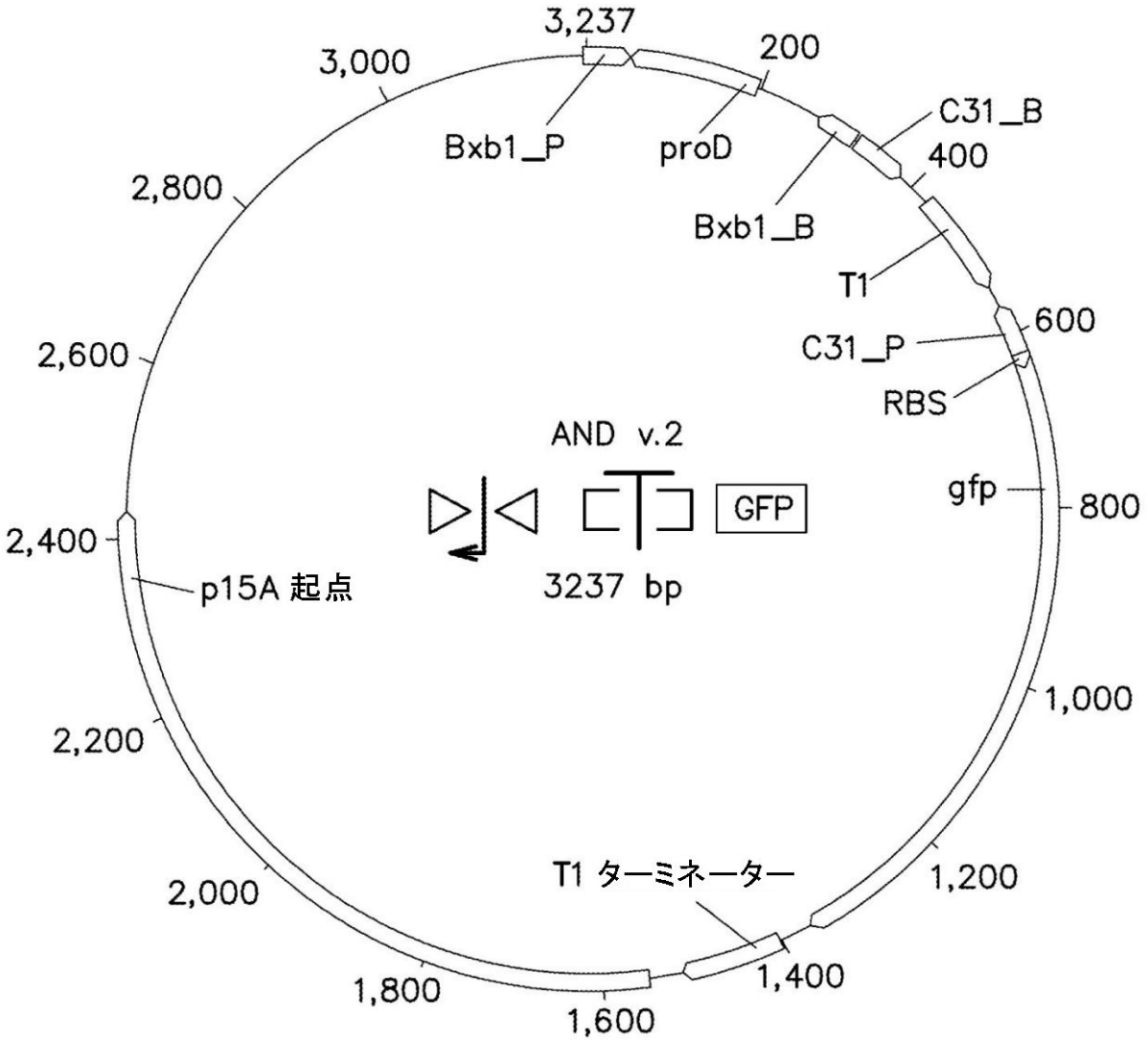

3,237
200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
Bxb1_P
proD
C31_B
Bxb1_B
T1
C31_P
RBS
gfp
AND v.2
GFP
3237 bp
p15A 起点
T1 ターミネーター

図 24

【図２５】

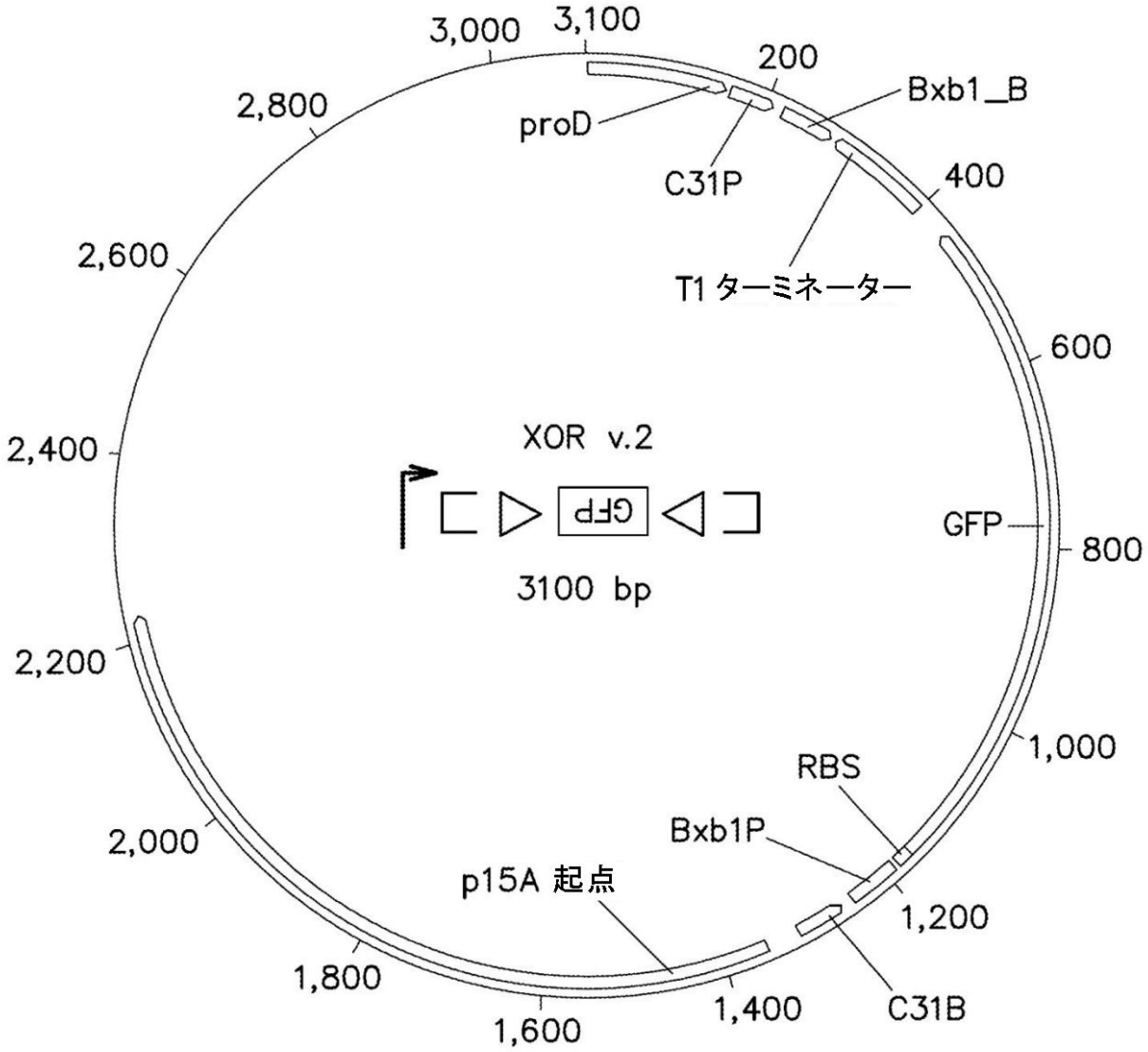

3,100
200
Bxb1_B
400
600
800
1,000
1,200
C31B
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
proD
C31P
T1 ターミネーター
XOR v.2
GFP
3100 bp
GFP
RBS
Bxb1P
p15A 起点

図 25

【図２６Ａ】

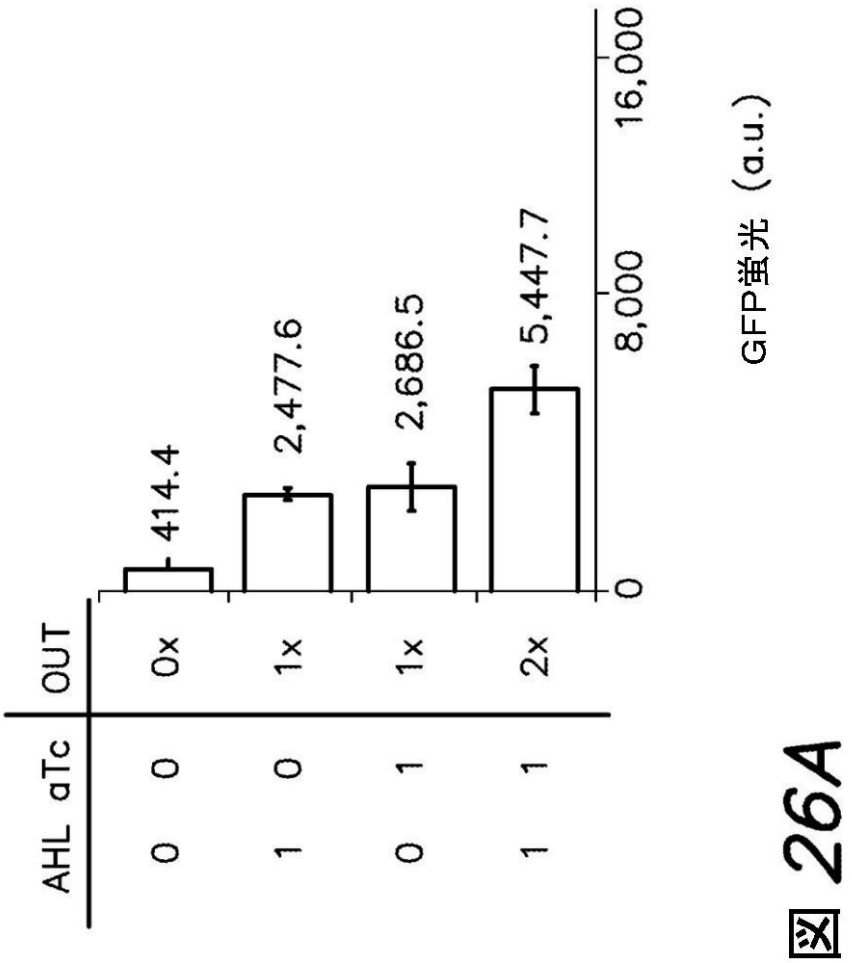
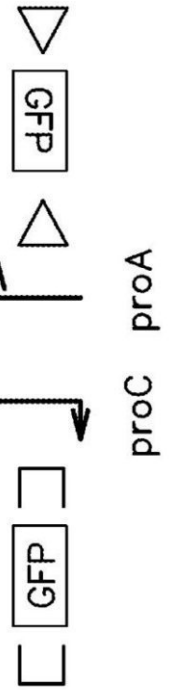

AHL aTc
OUT
0 0
0x
1 0
1x
0 1
1x
1 1
2x
414.4
2,477.6
2,686.5
5,447.7
0
8,000
16,000
GFP蛍光 (a.u.)

図 26A


GFP
proC
proA

【図２６Ｂ】

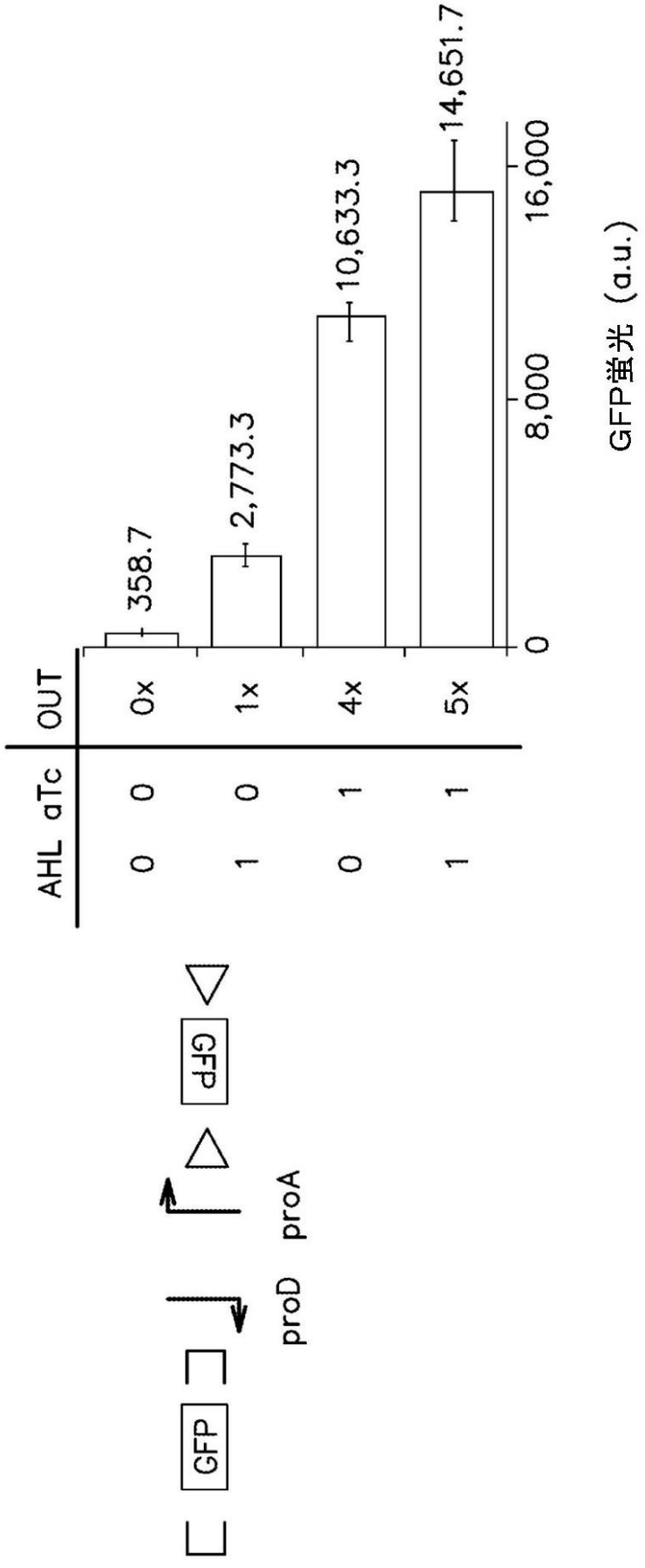

AHL aTc OUT
0 0 0x
1 0 1x
0 1 4x
1 1 5x
358.7
2,773.3
10,633.3
14,651.7
0
8,000
16,000
GFP蛍光 (a.u.)
GFP
proD proA
GFP

図 26B

【図２６Ｃ】

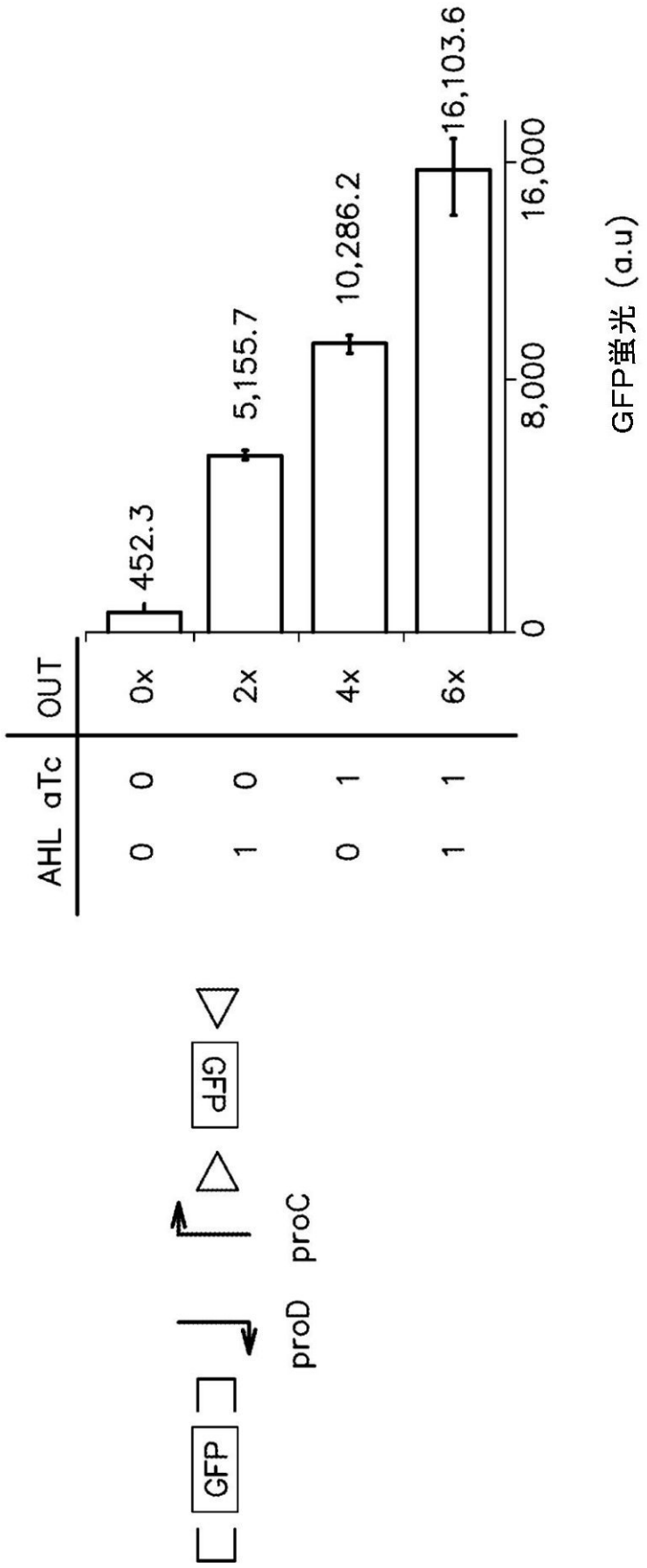

AHL aTc OUT
0 0 0x
1 0 2x
0 1 4x
1 1 6x
452.3
5,155.7
10,286.2
16,103.6
0
8,000
16,000
GFP蛍光 (a.u)
GFP
proD
proC
GFP

図 26C

【図２７】

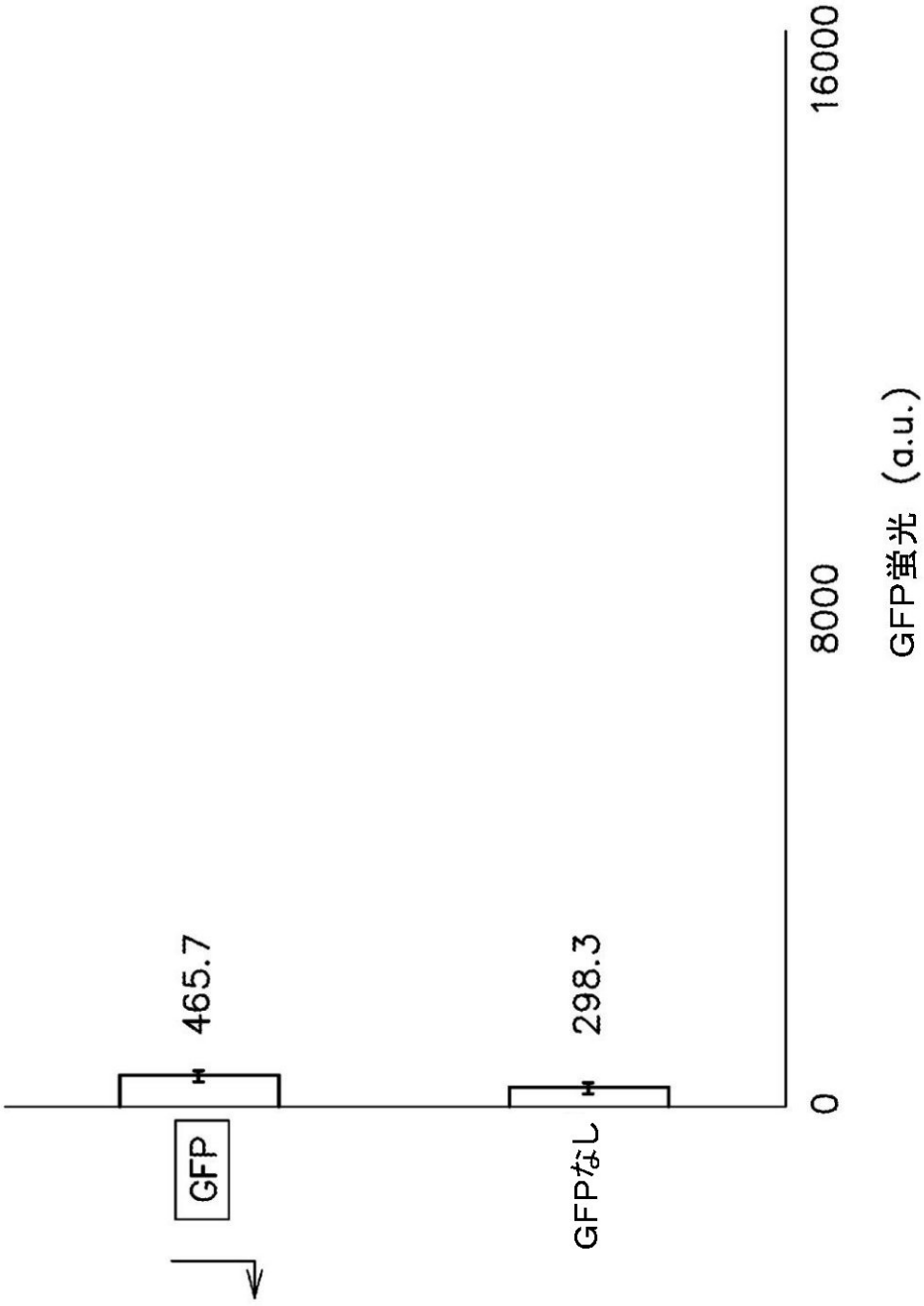


図27

【図２８】

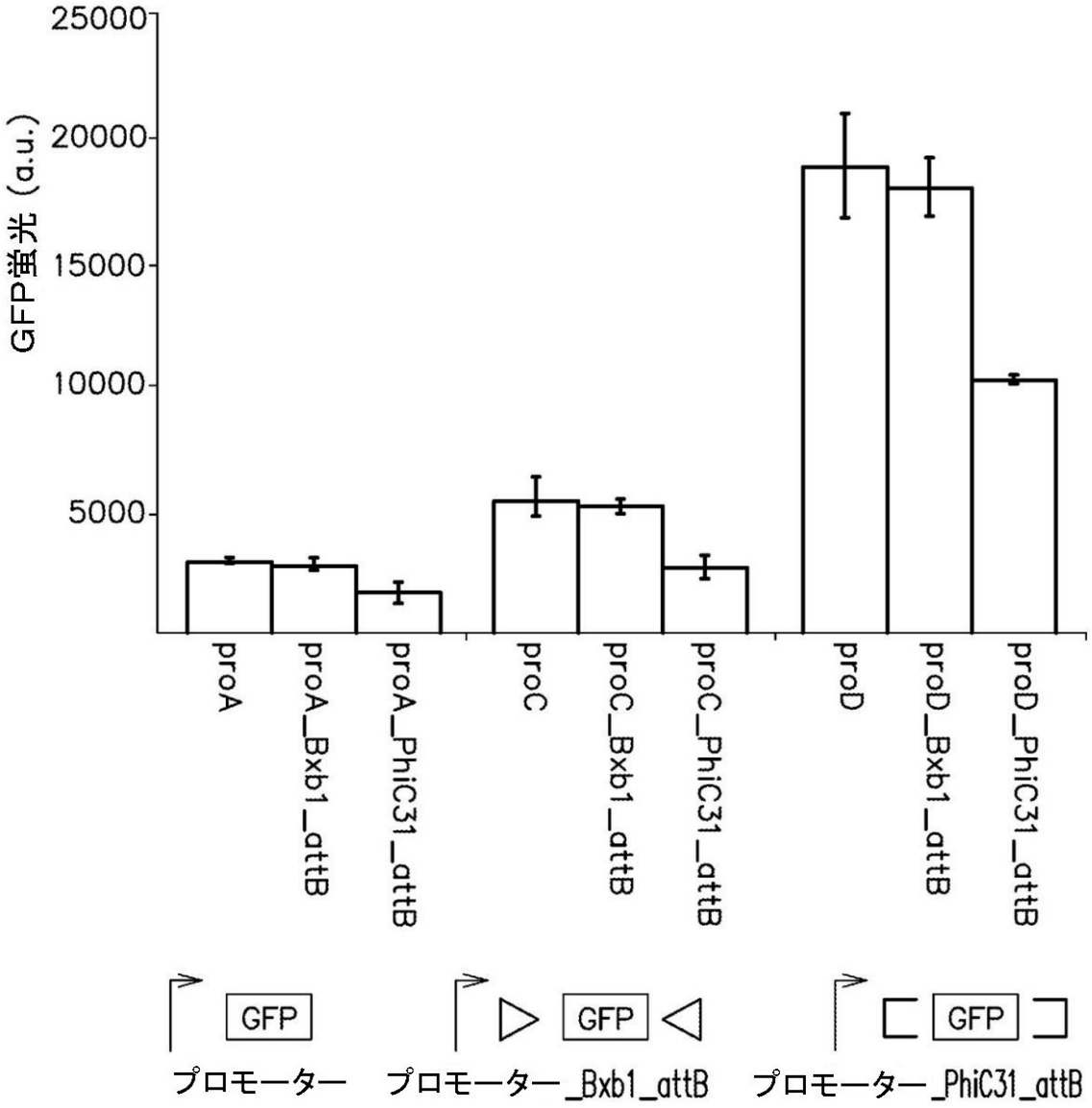

25000
20000
15000
10000
5000
GFP蛍光 (a.u.)
proA
proA_Bxb1_attB
proA_PhiC31_attB
proC
proC_Bxb1_attB
proC_PhiC31_attB
proD
proD_Bxb1_attB
proD_PhiC31_attB
GFP
GFP
GFP
プロモーター
プロモーター_Bxb1_attB
プロモーター_PhiC31_attB

図 28

【図２９】

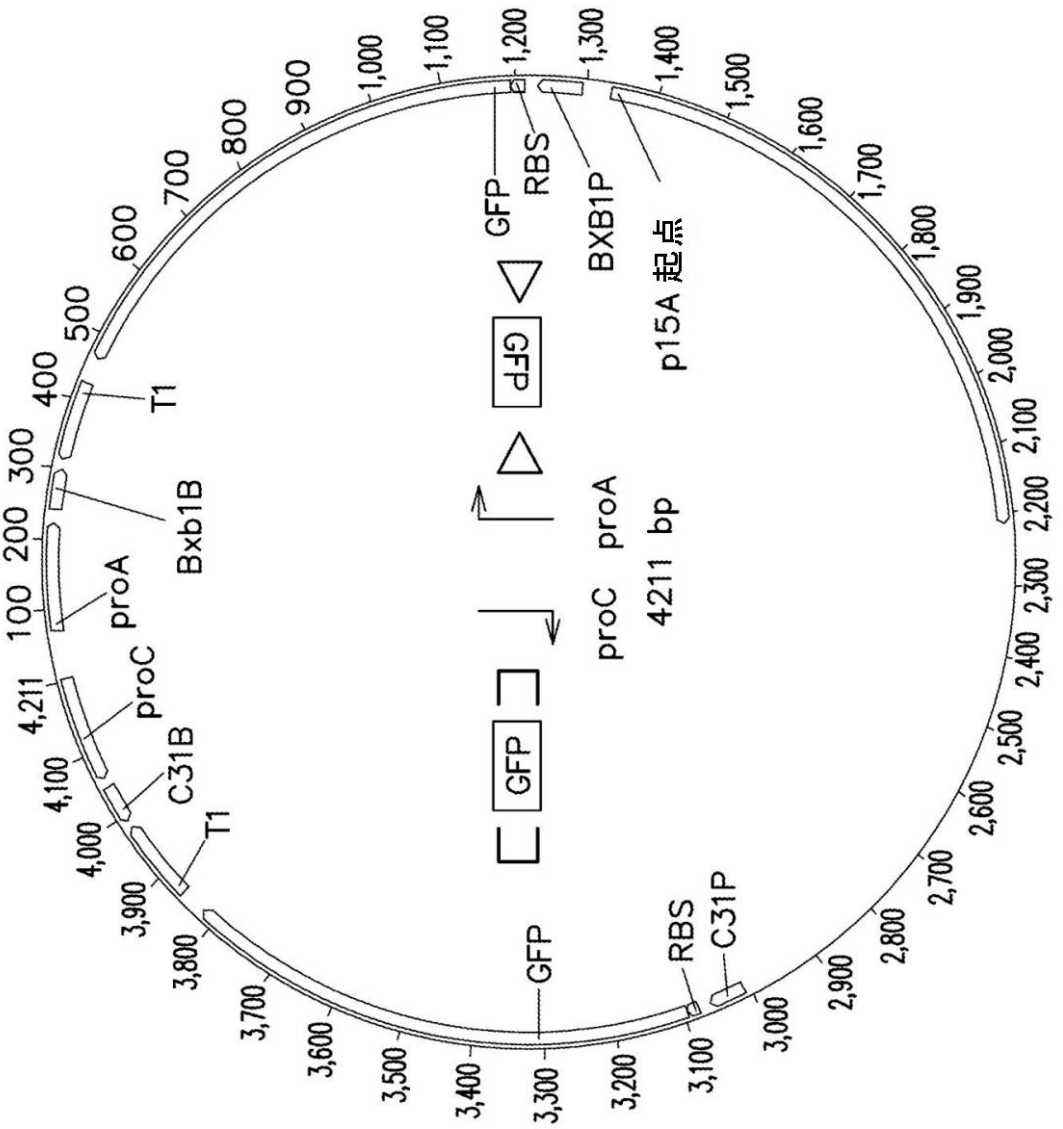

GFP
RBS
BXB1P
p15A 起点
GFP
proC proA
4211 bp
GFP
RBS
C31P
GFP
T1
C31B
proC
proA
Bxb1B
T1

図 29

【図３０】

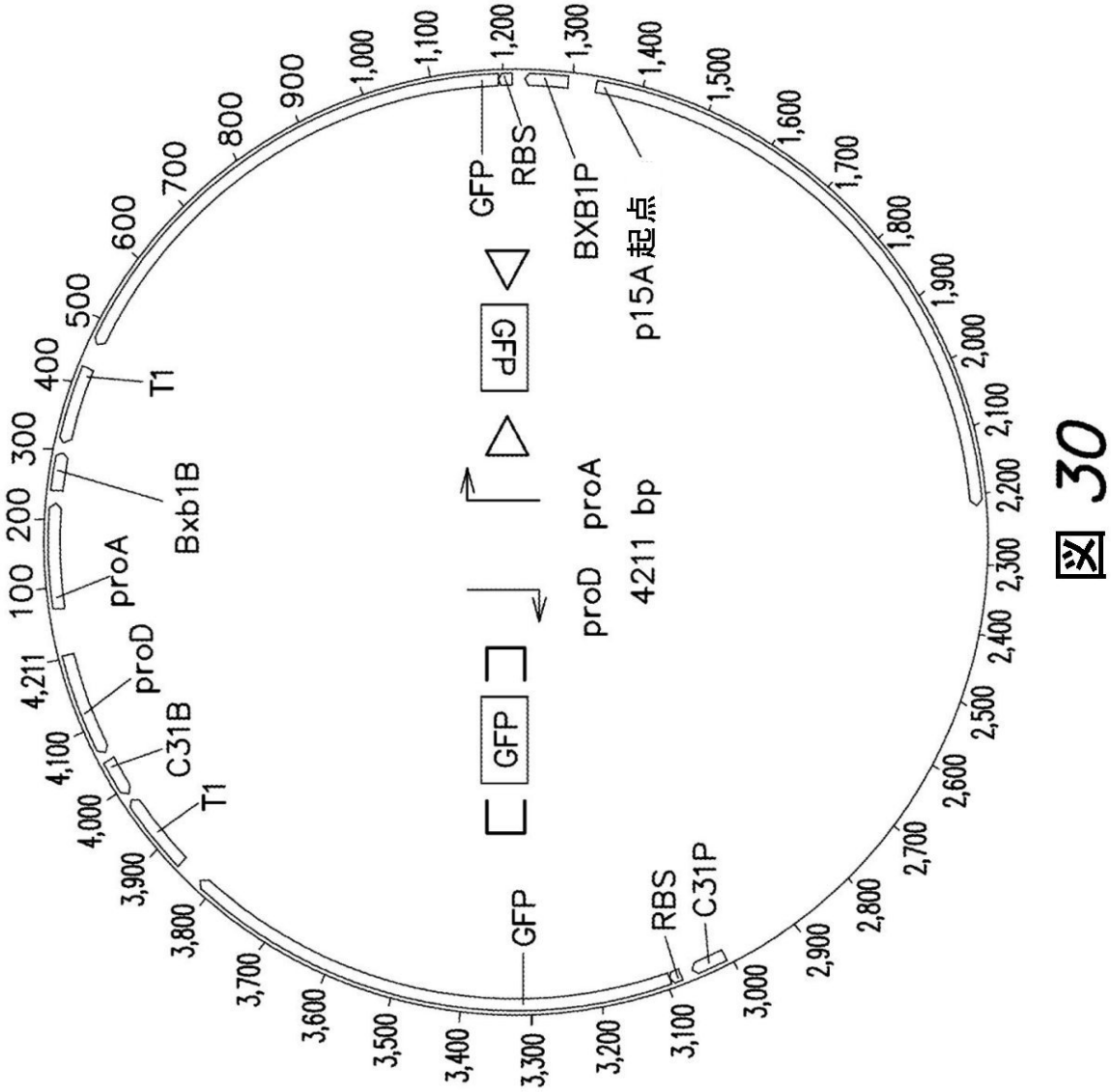

GFP
RBS
BXB1P
p15A起点
GFP
proD proA
4211 bp
GFP
RBS
C31P
GFP
T1
C31B
proD
proA
Bxb1B
T1

図 30

【図３１】

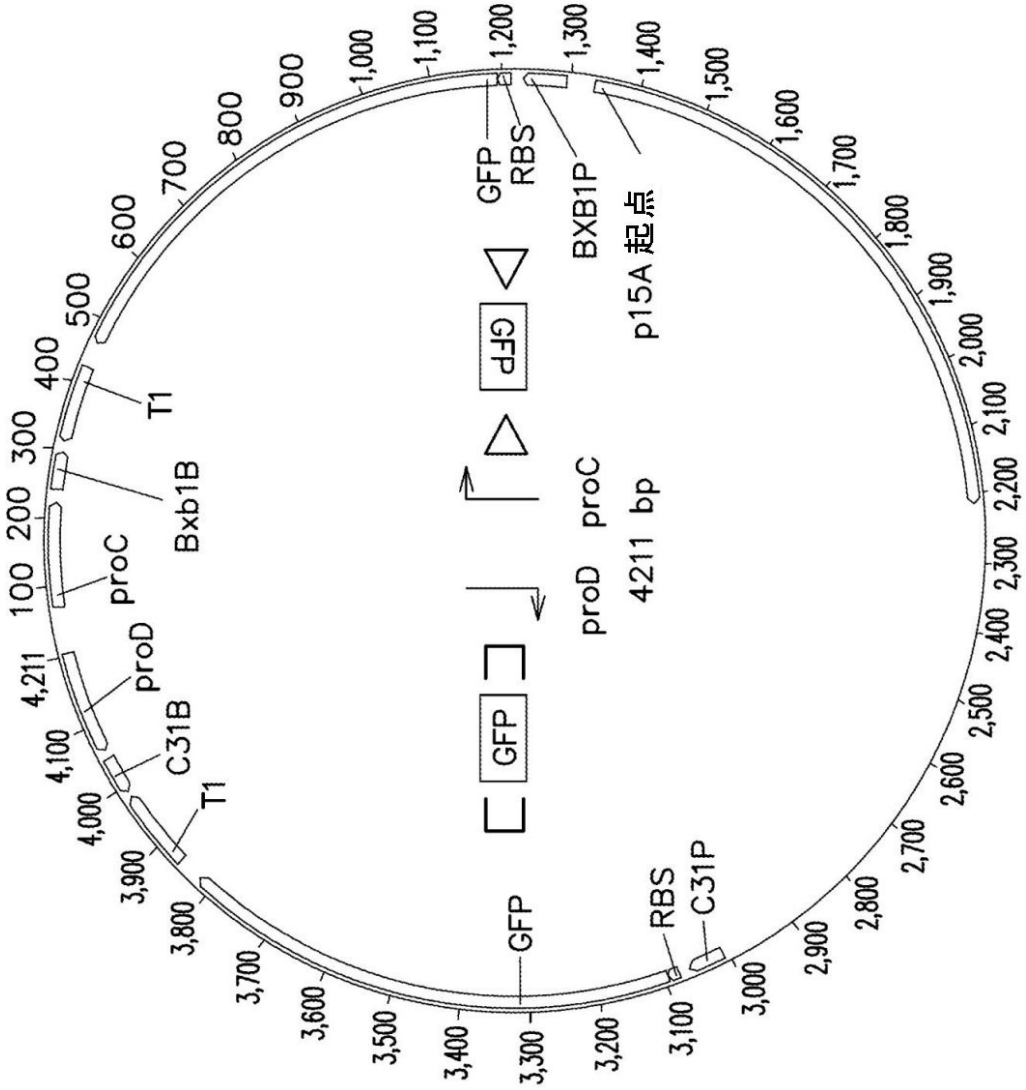

GFP
RBS
BXB1P
p15A 起点
GFP
proD proC
4211 bp
GFP
RBS
C31P
GFP
T1
C31B
proD
proC
Bxb1B
T1

図 31

【図３２】

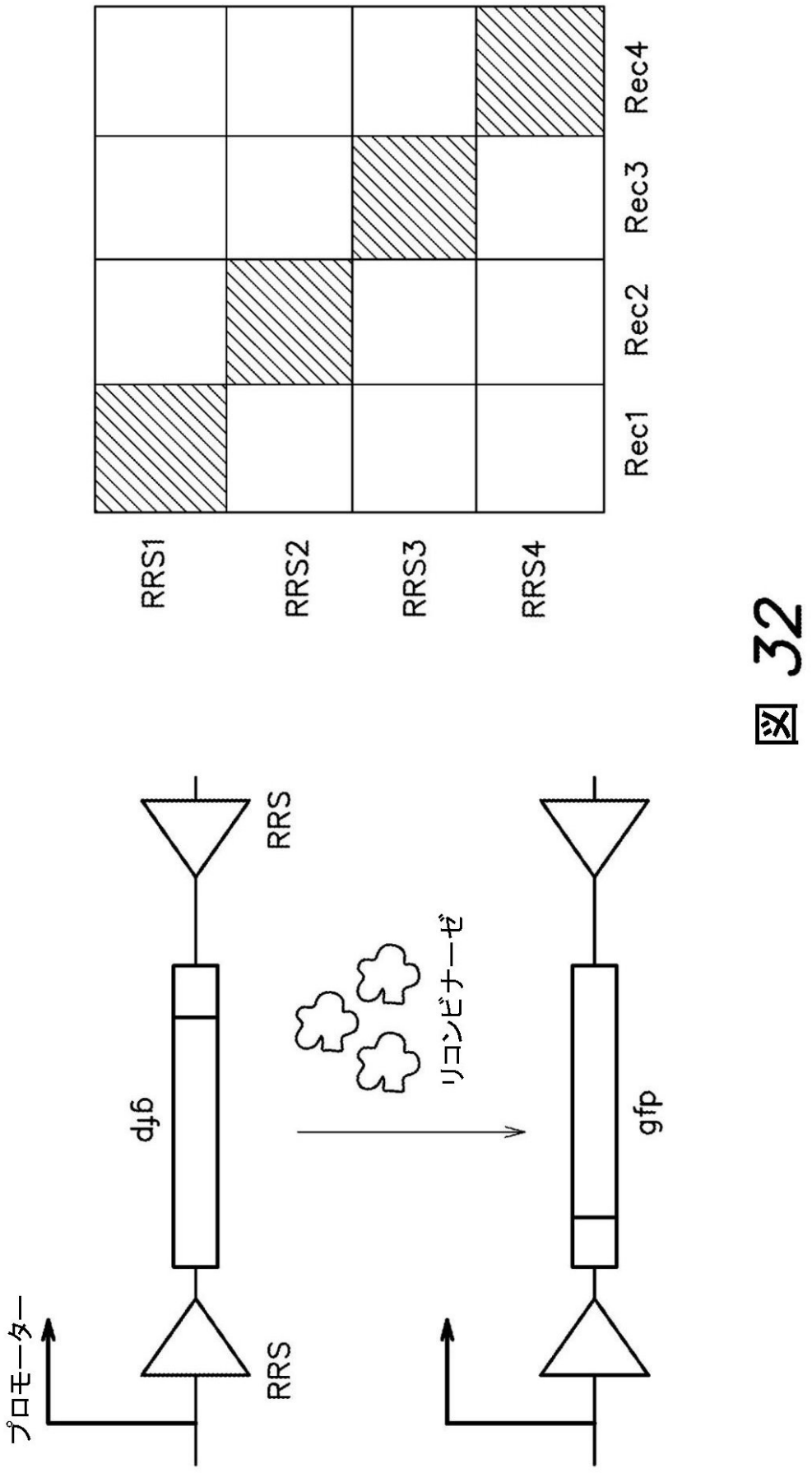

RRS1
RRS2
RRS3
RRS4
Rec1
Rec2
Rec3
Rec4
プロモーター
RRS
dj6
RRS
リコンビナーゼ
gfp

図 32

【図３３】

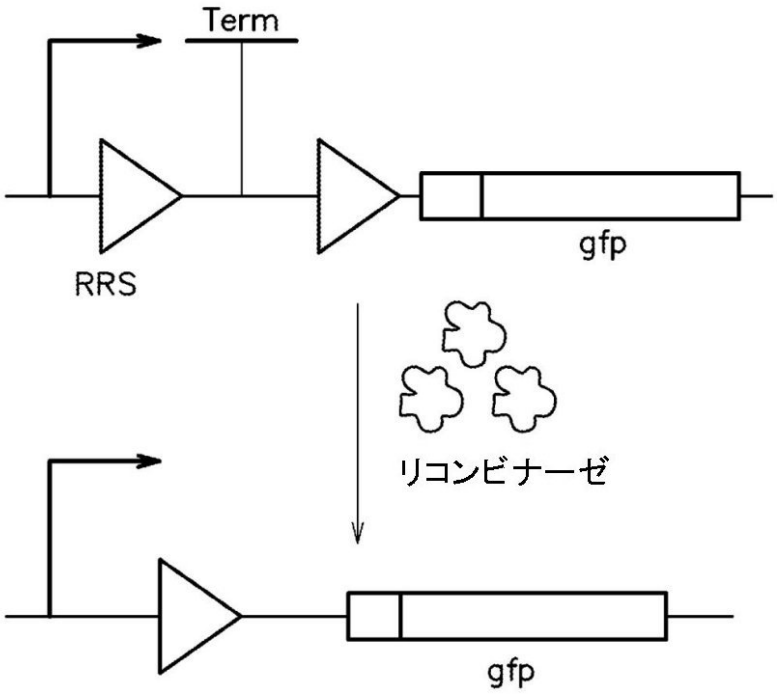


図 33

【図３４－１】

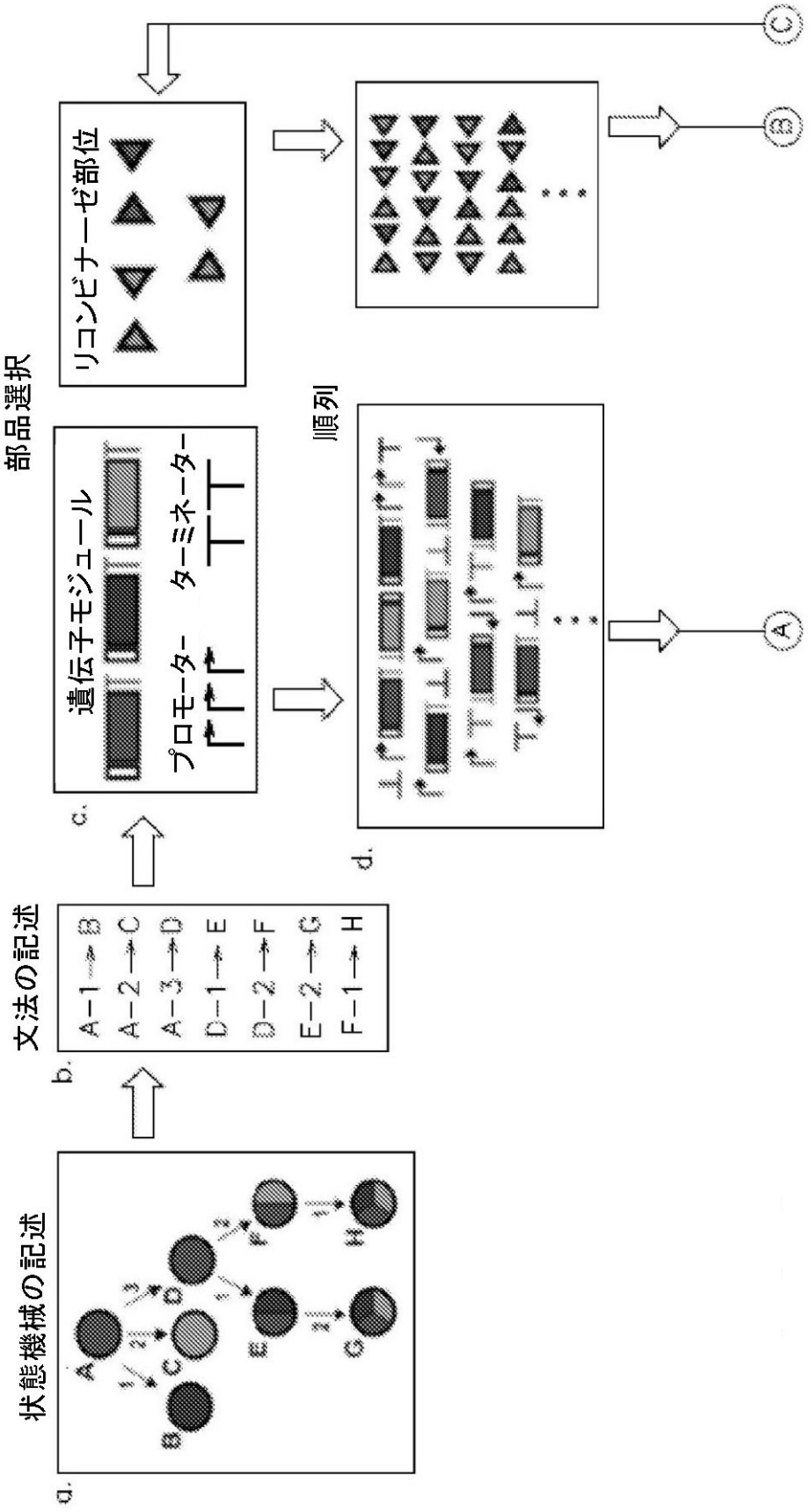

状態機械の記述
文法の記述
部品選択
順列
遺伝子モジュール
プロモーター
ターミネーター
リコンビナーゼ部位
A－1→B
A－2→C
A－3→D
D－1→E
D－2→F
E－2→G
F－1→H
a.
b.
c.
d.
A
B
C

図 34－1

【図３４－２】

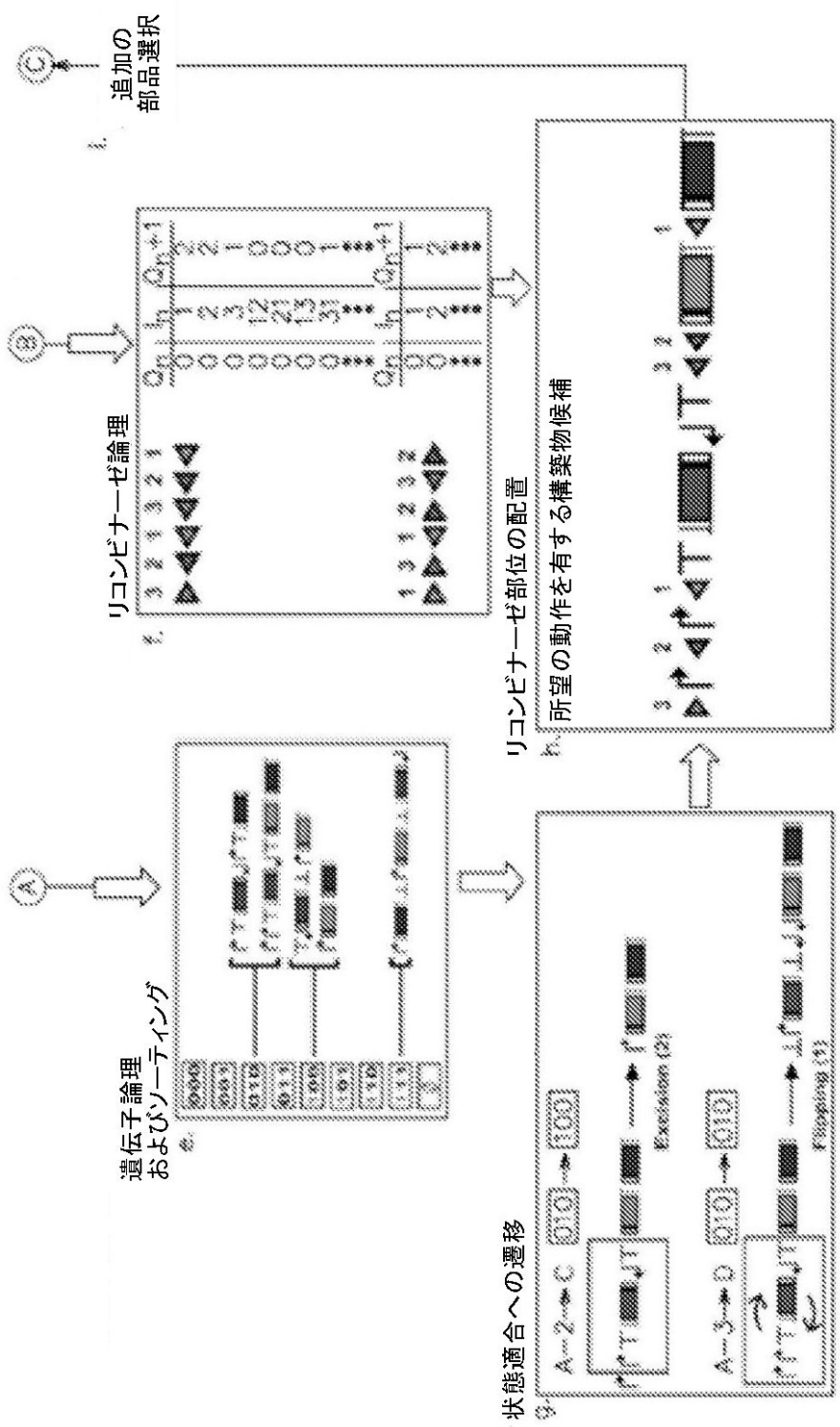

追加の
部品選択
リコンビナーゼ論理
遺伝子論理
およびソーティング
リコンビナーゼ部位の配置
所望の動作を有する構築物候補
状態適合への遷移

図 34-2

【図３５】

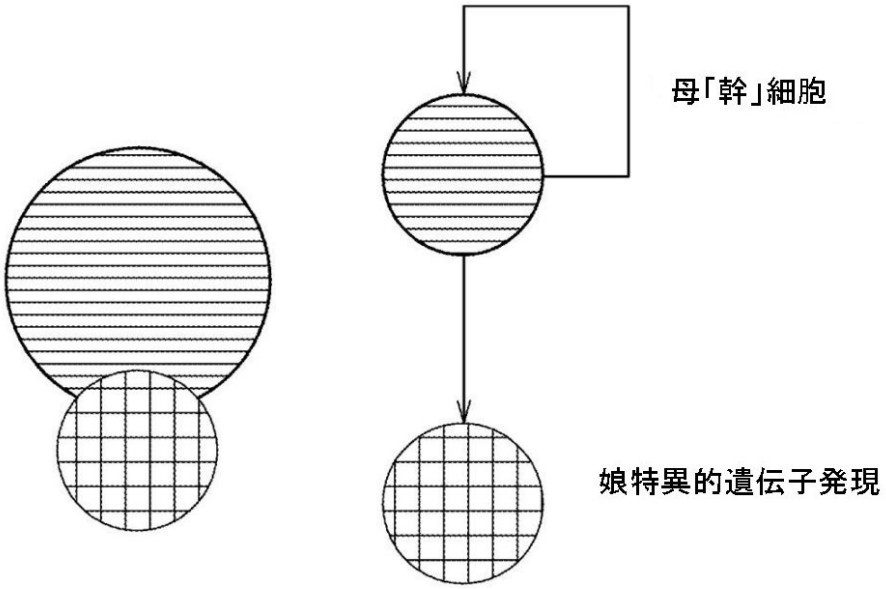


図 35

【図３６】

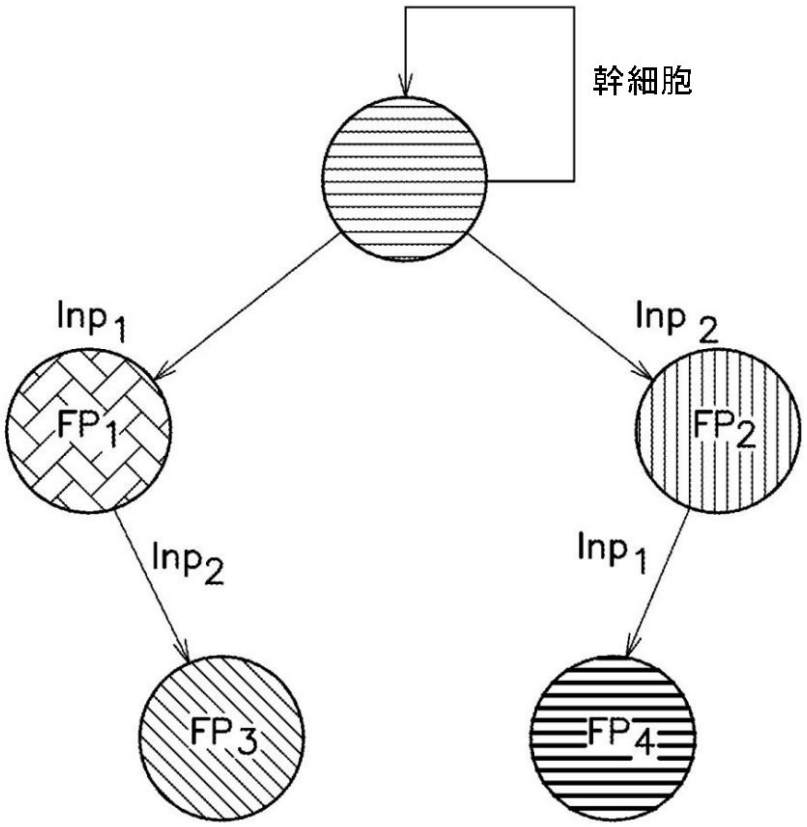


図 36

【図３７Ａ】

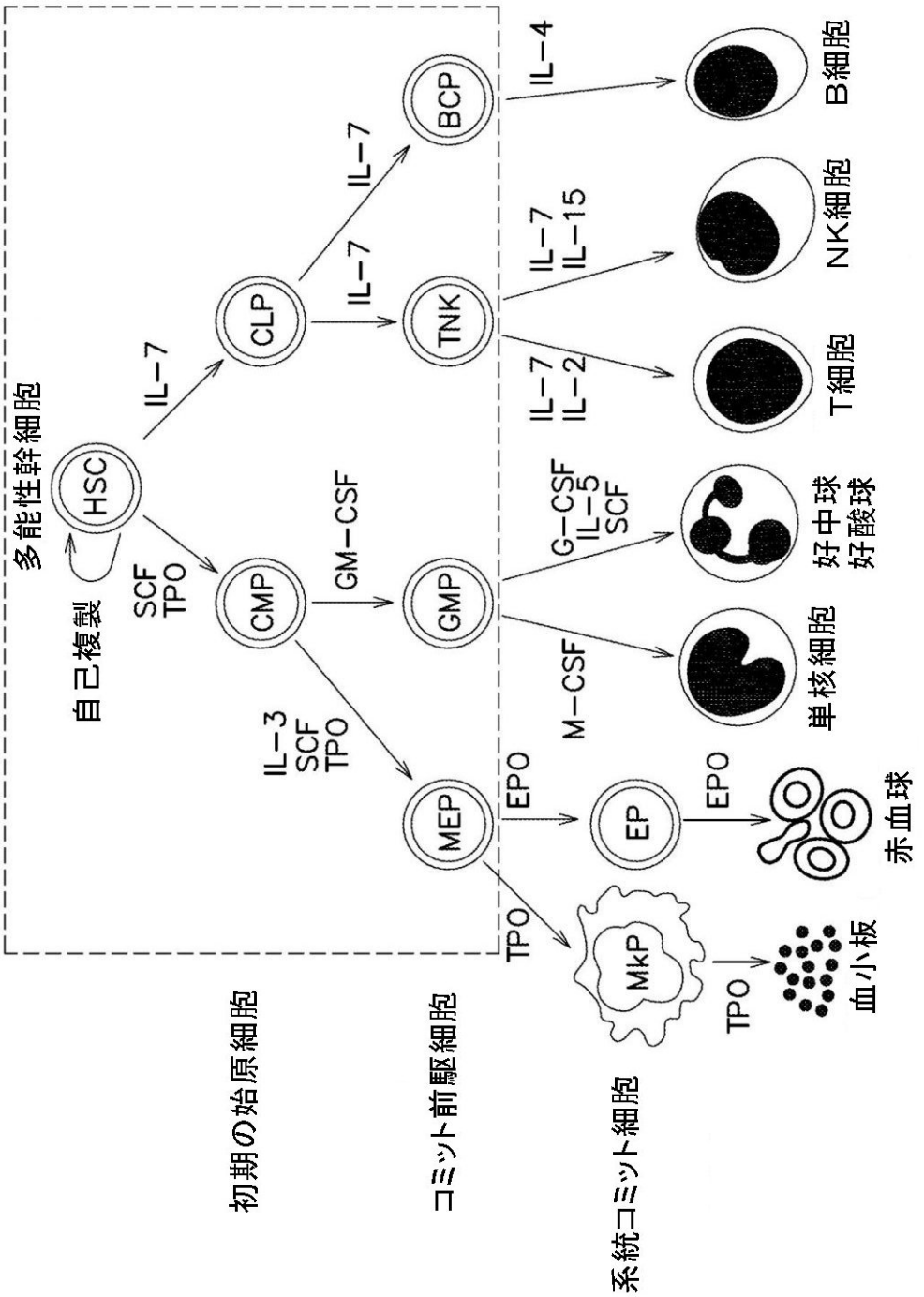

多能性幹細胞
HSC
自己複製
SCF
TPO
IL-7
CLP
IL-7
BCP
IL-4
B細胞
IL-7
TNK
IL-7
IL-15
NK細胞
IL-7
IL-2
T細胞
CMP
GM-CSF
GMP
G-CSF
IL-5
SCF
好中球
好酸球
IL-3
SCF
TPO
M-CSF
単核細胞
MEP
EPO
EP
EPO
赤血球
TPO
MkP
TPO
血小板
初期の始原細胞
コミット前駆細胞
系統コミット細胞

図 37A

【図３７Ｂ】

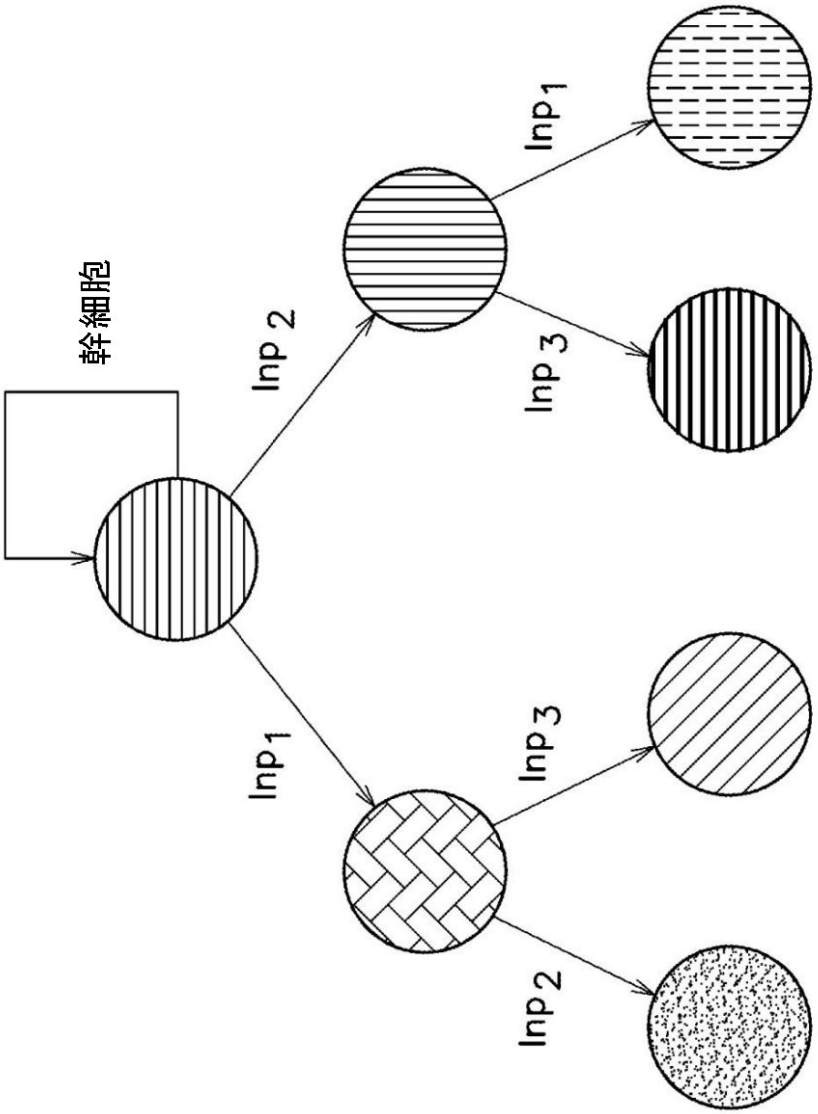


図 37B

【図３８Ａ】

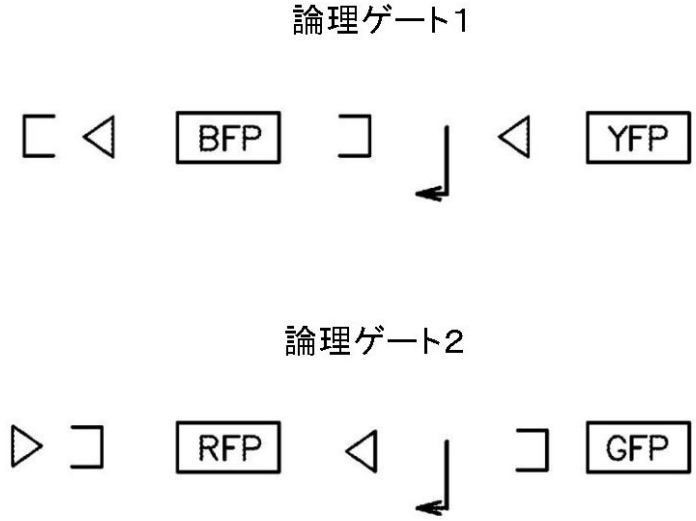


図 38A

【図３８Ｂ】

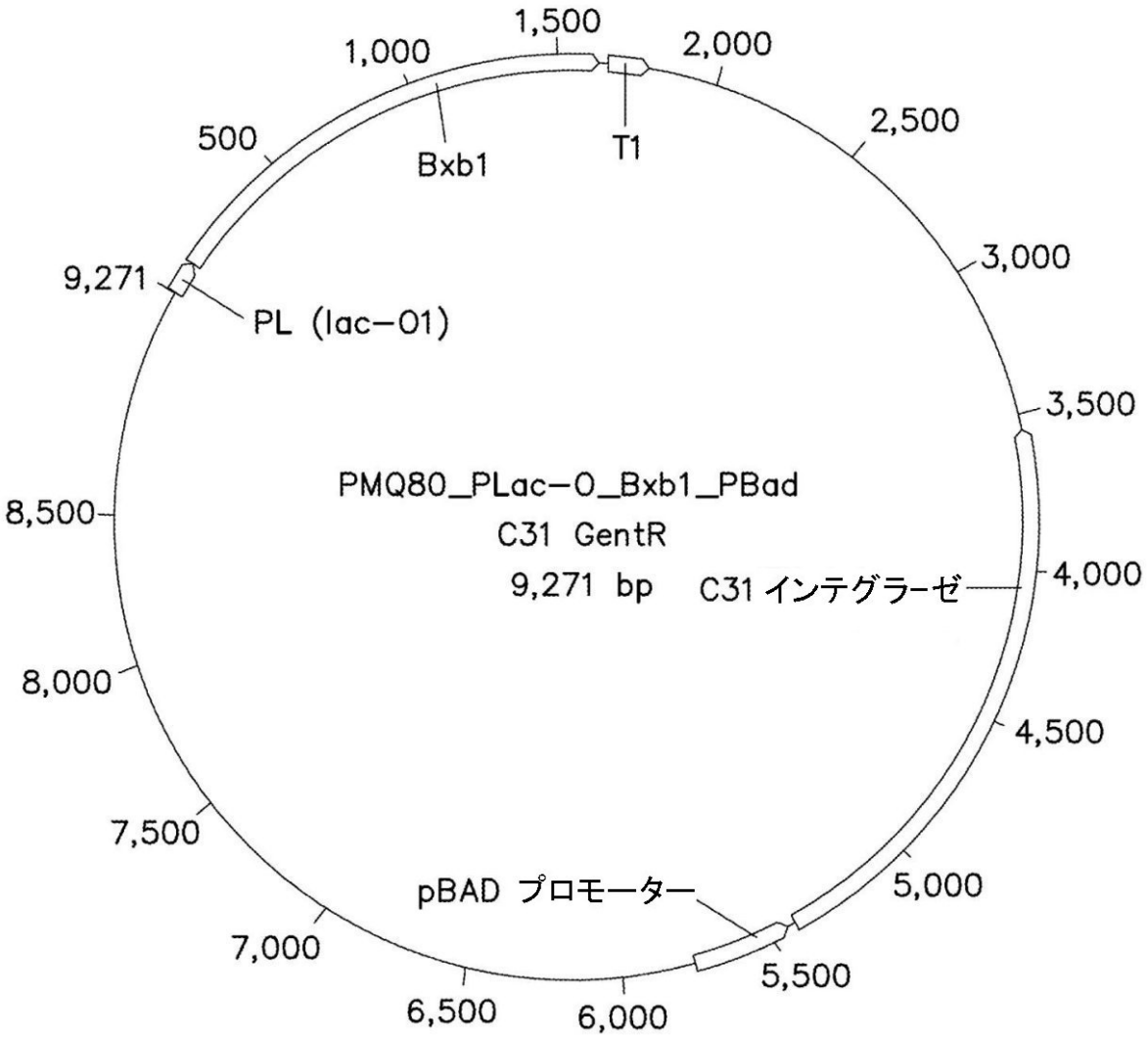

1,500
1,000
2,000
500
2,500
Bxb1
T1
9,271
3,000
PL (lac−01)
3,500
PMQ80_PLac−O_Bxb1_PBad
C31 GentR
8,500
9,271 bp
C31 インテグラーゼ
4,000
8,000
4,500
7,500
5,000
pBAD プロモーター
7,000
5,500
6,500
6,000

図 38B

【図３８Ｃ】

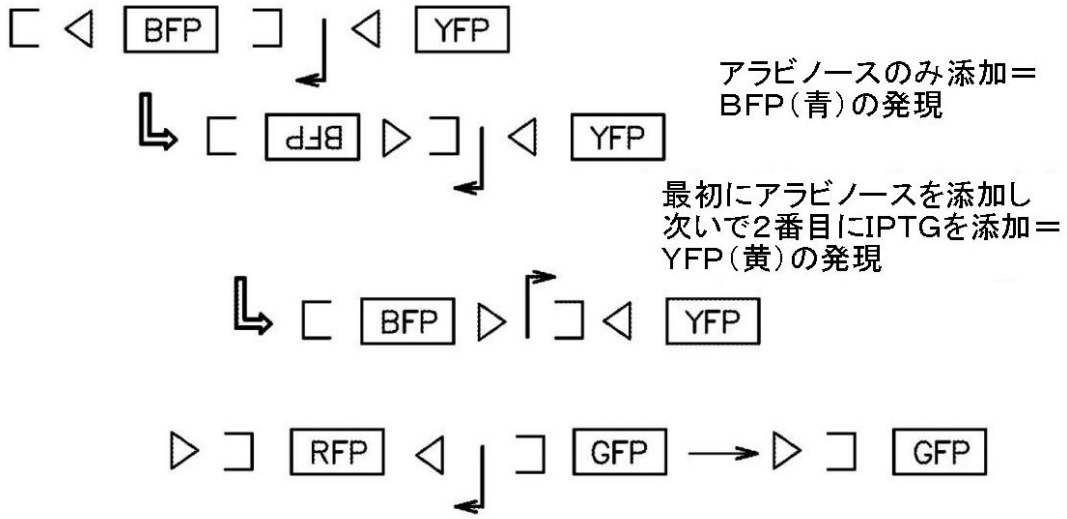


図 38C

【図３８Ｄ】

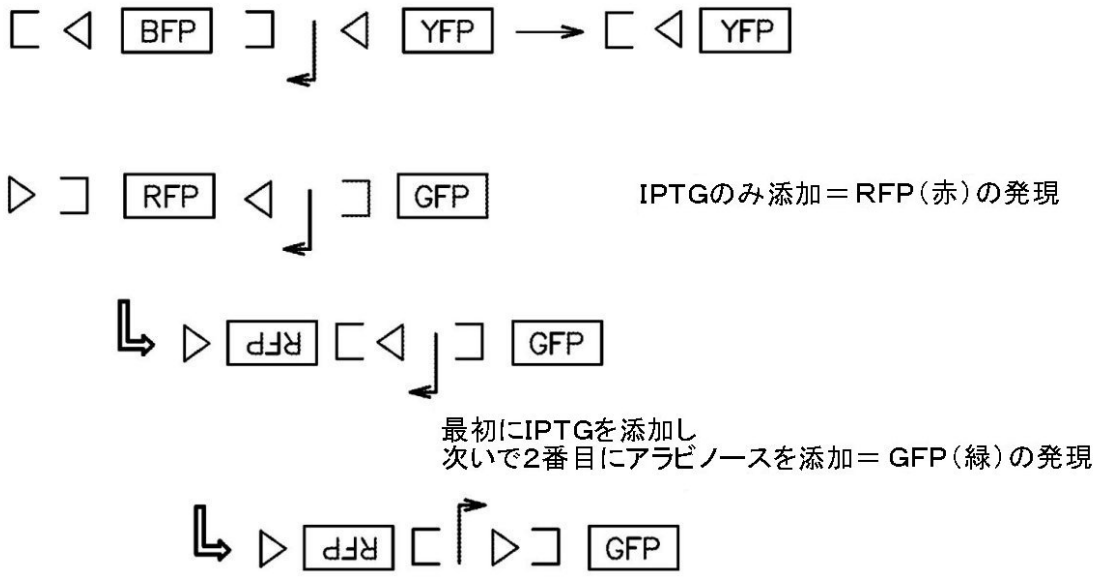


図 38D

【図３８Ｅ】

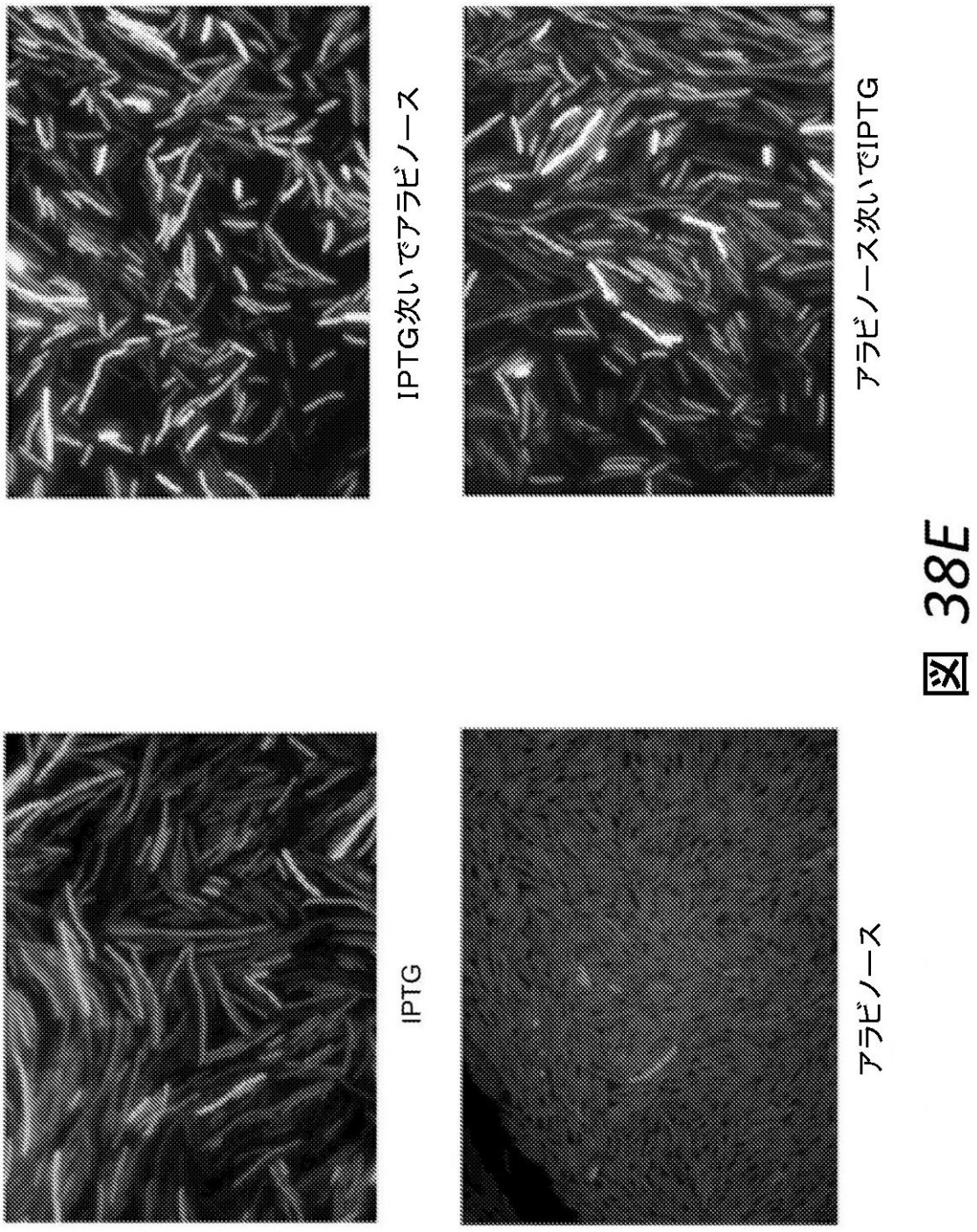


図 38E

【図３９Ａ】

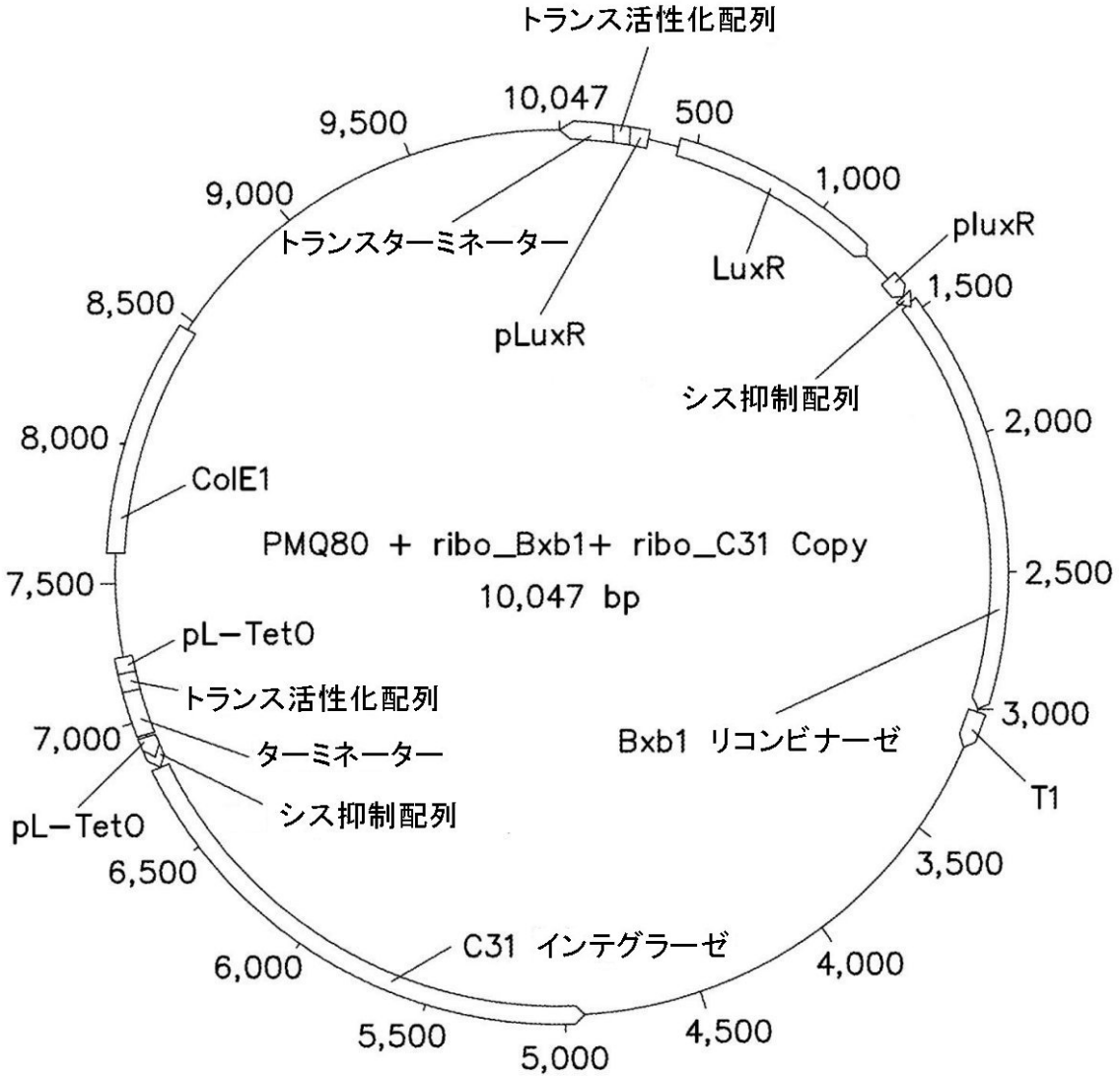

トランス活性化配列
10,047
500
1,000
pluxR
1,500
2,000
2,500
3,000
T1
3,500
4,000
4,500
5,000
5,500
6,000
6,500
7,000
7,500
8,000
8,500
9,000
9,500
トランスターミネーター
pLuxR
LuxR
シス抑制配列
ColE1
PMQ80 + ribo_Bxb1+ ribo_C31 Copy
10,047 bp
pL−TetO
トランス活性化配列
ターミネーター
シス抑制配列
pL−TetO
Bxb1 リコンビナーゼ
C31 インテグラーゼ

図 39A

【図３９Ｂ】

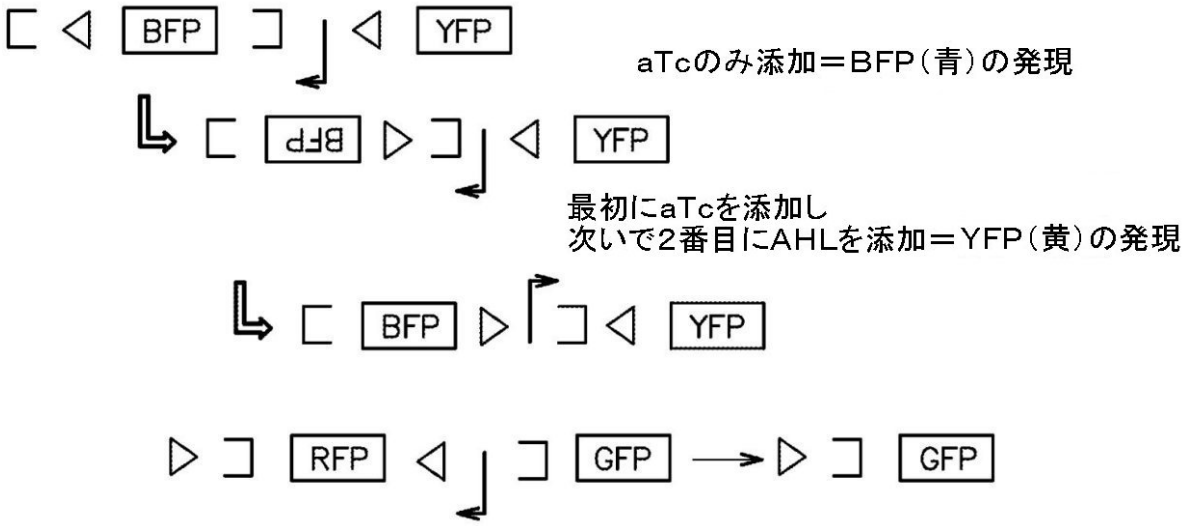

BFP
YFP
aTcのみ添加＝BFP（青）の発現
BFP
YFP
最初にaTcを添加し
次いで2番目にAHLを添加＝YFP（黄）の発現
BFP
YFP
RFP
GFP
GFP

図 39B

【図３９Ｃ】

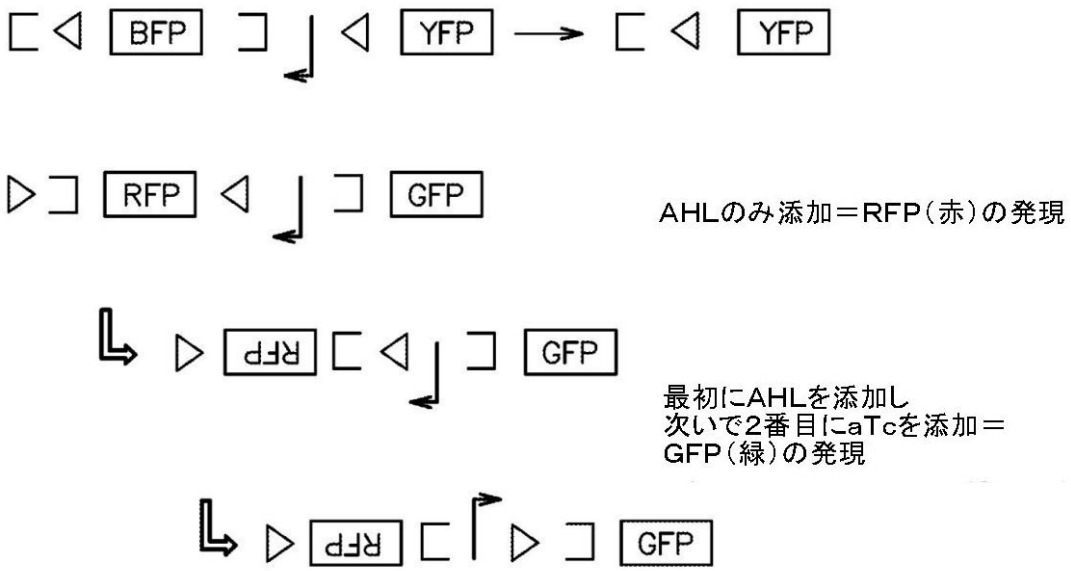

BFP
YFP
YFP
RFP
GFP
AHLのみ添加＝RFP（赤）の発現
RFP
GFP
最初にAHLを添加し
次いで2番目にaTcを添加＝
GFP（緑）の発現
RFP
GFP

図 39C

【図４０Ａ】

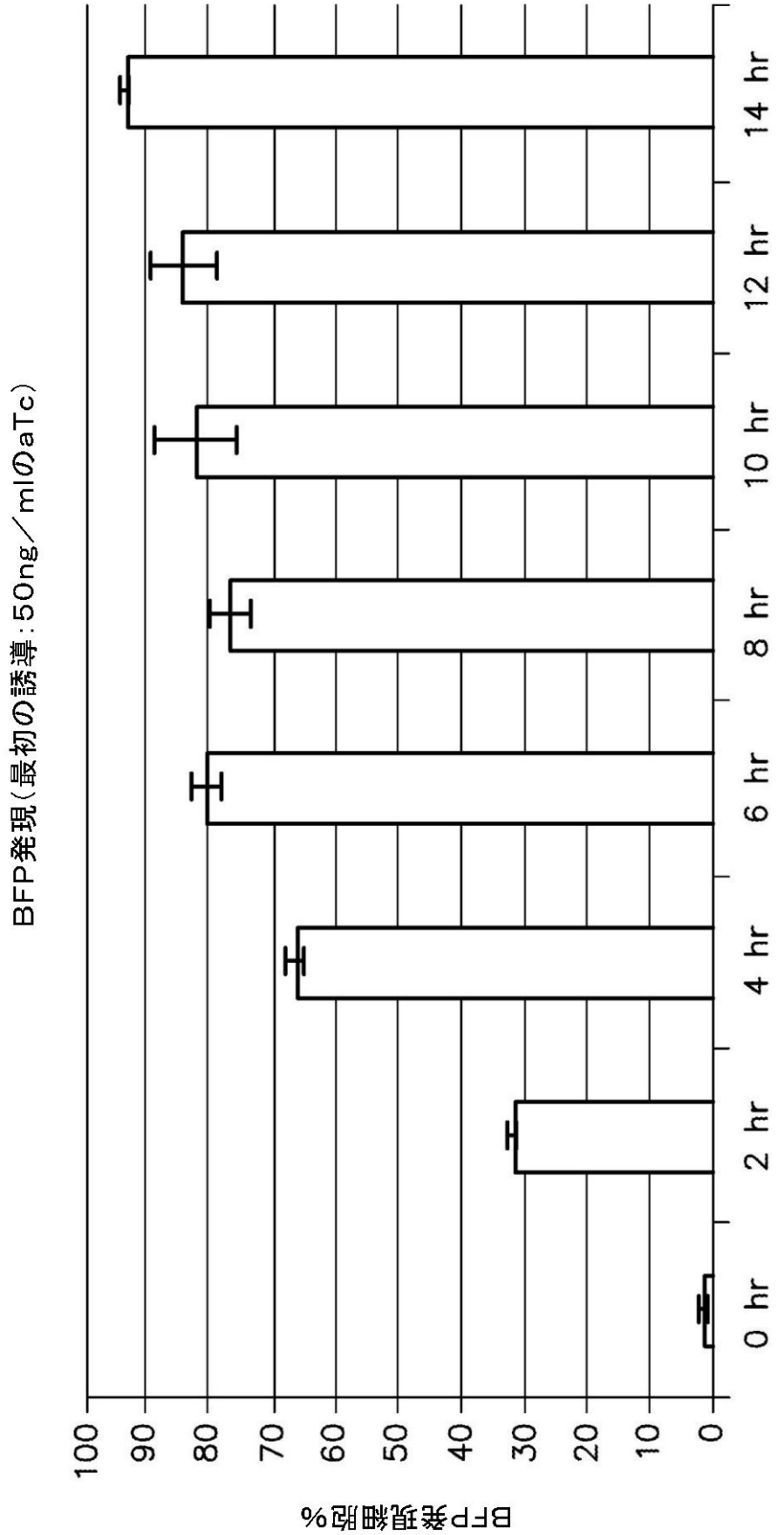

BFP発現（最初の誘導：50ng／mlのaTc）
BFP発現細胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 hr
2 hr
4 hr
6 hr
8 hr
10 hr
12 hr
14 hr

図 40A

【図４０Ｂ】

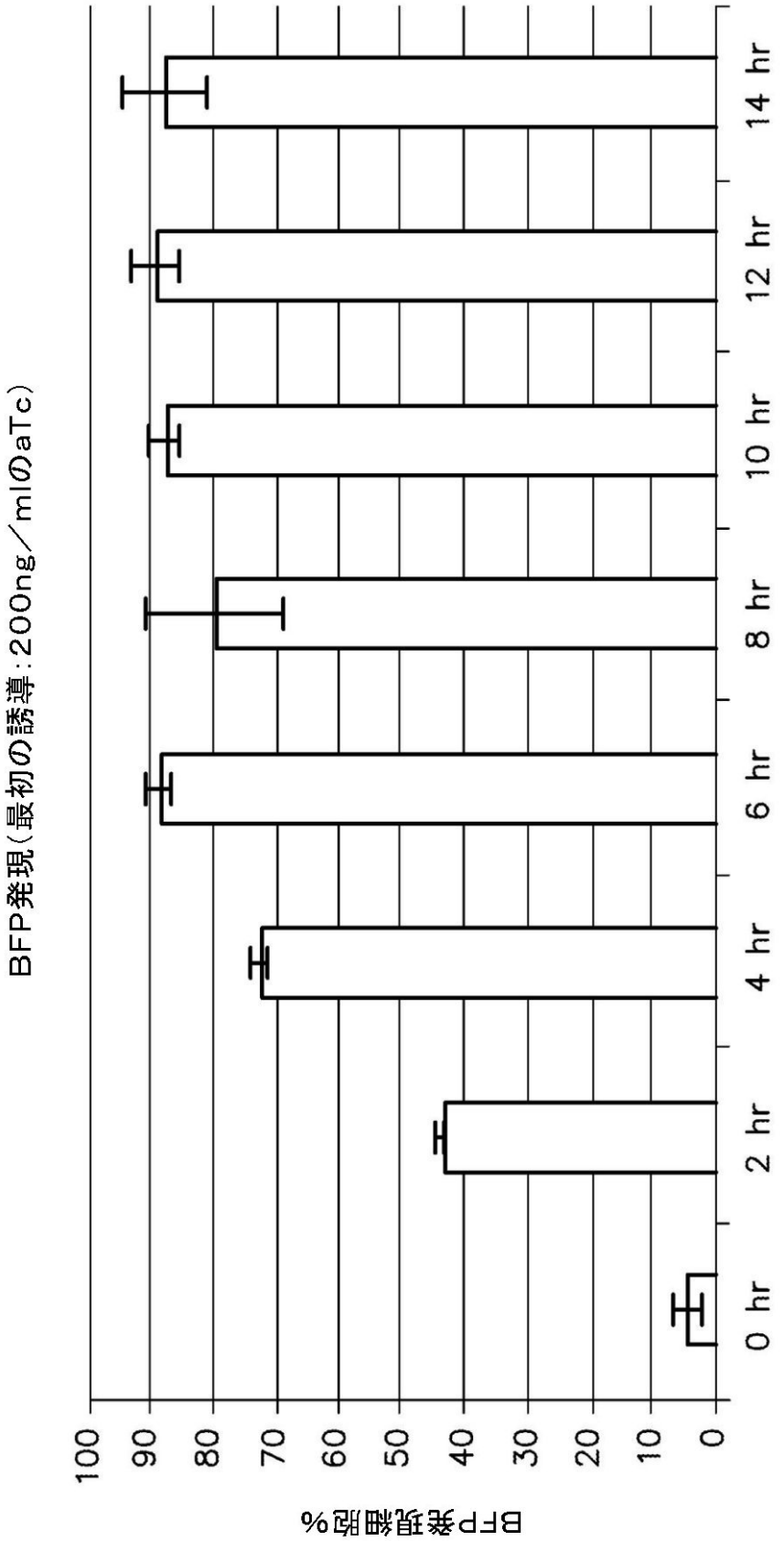

BFP発現細胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 hr
2 hr
4 hr
6 hr
8 hr
10 hr
12 hr
14 hr
BFP発現(最初の誘導:200ng／mlのaTc)

図 40B

【図４０Ｃ】

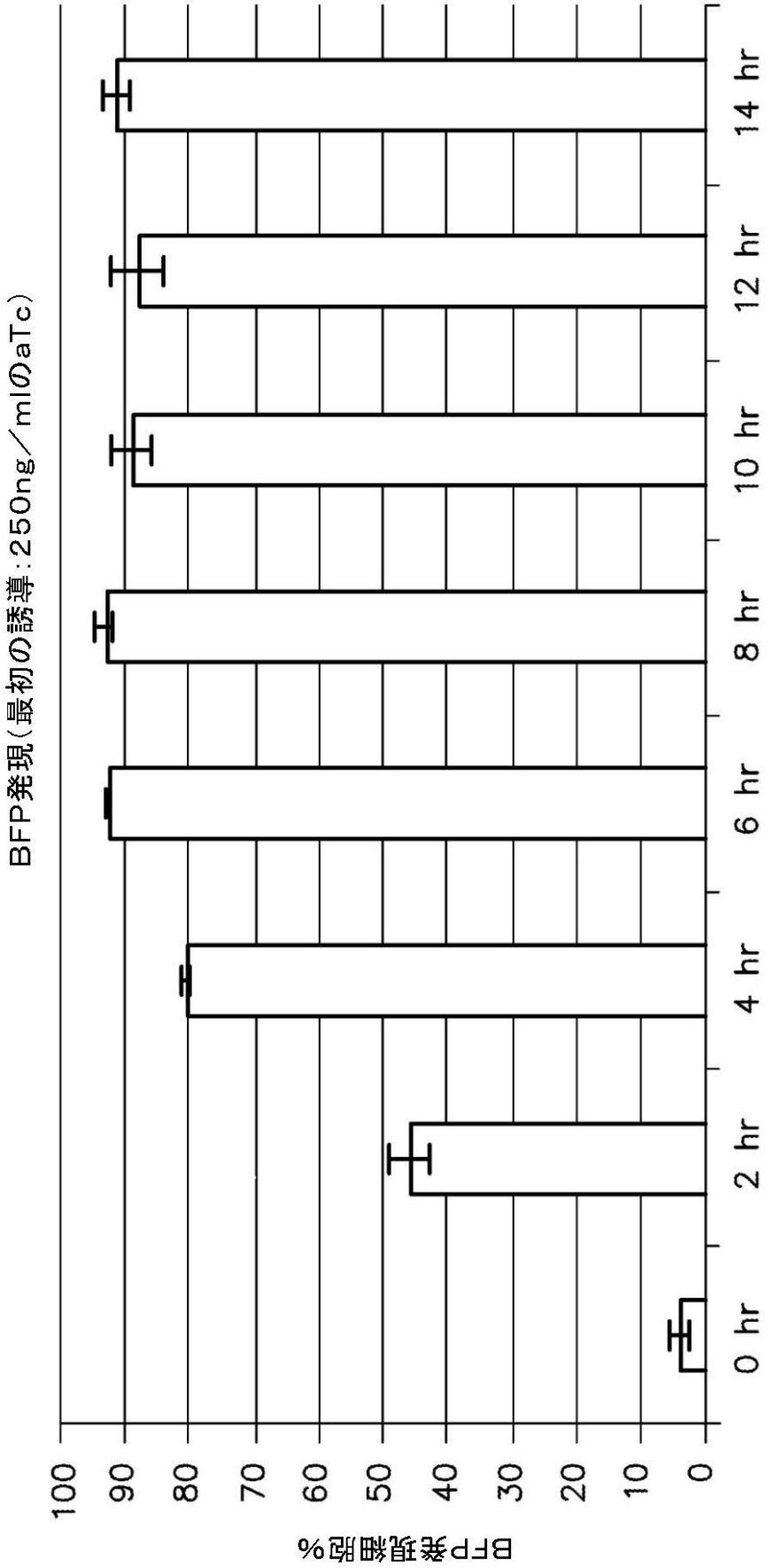

BFP発現（最初の誘導：250ng／mlのaTc）
BFP発現細胞%
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0 hr
2 hr
4 hr
6 hr
8 hr
10 hr
12 hr
14 hr

図 40C

【図４０Ｄ】

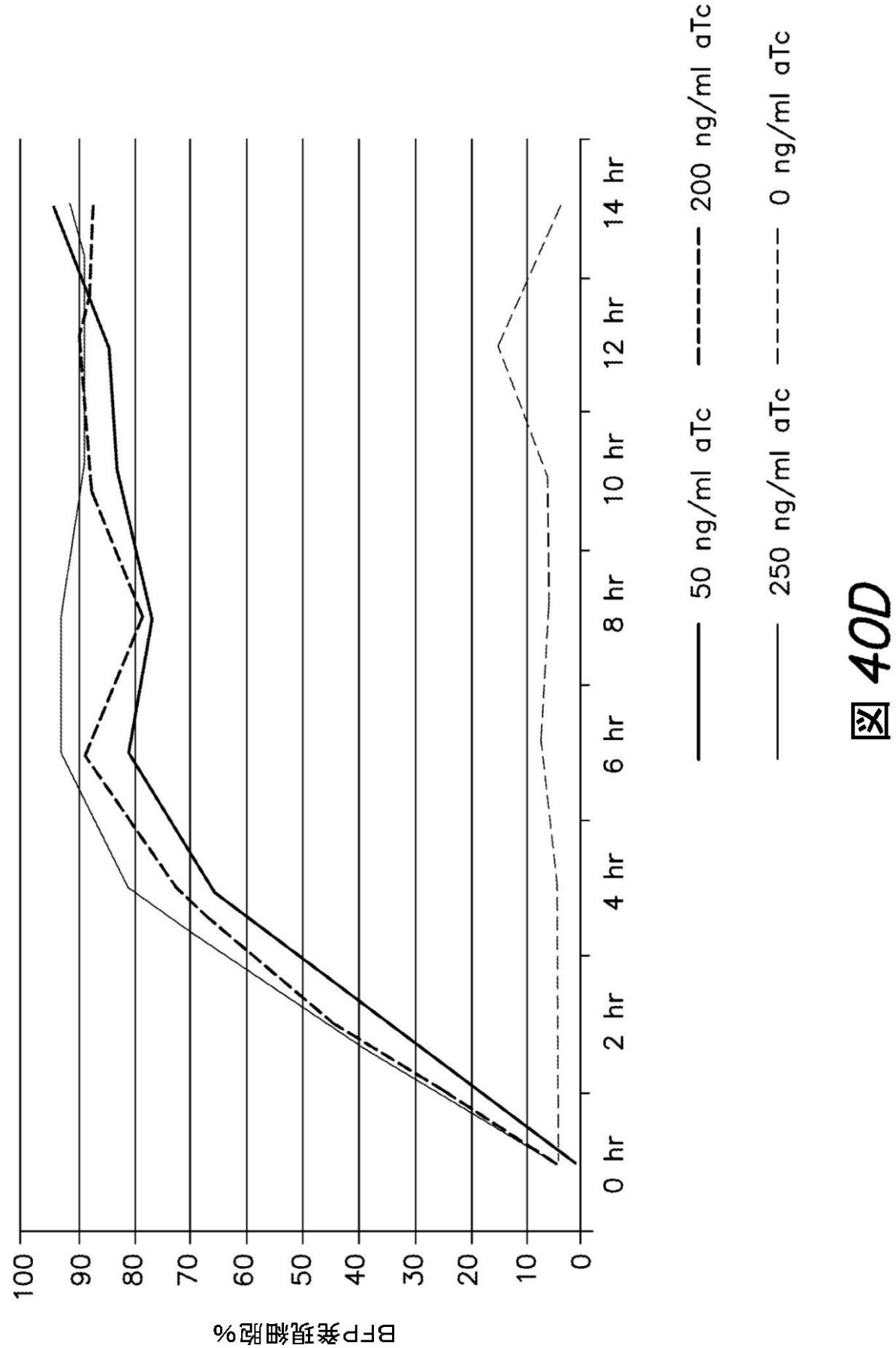

BFP発現細胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 hr
2 hr
4 hr
6 hr
8 hr
10 hr
12 hr
14 hr
50 ng/ml aTc
200 ng/ml aTc
250 ng/ml aTc
0 ng/ml aTc

図 40D

【図４１Ａ】

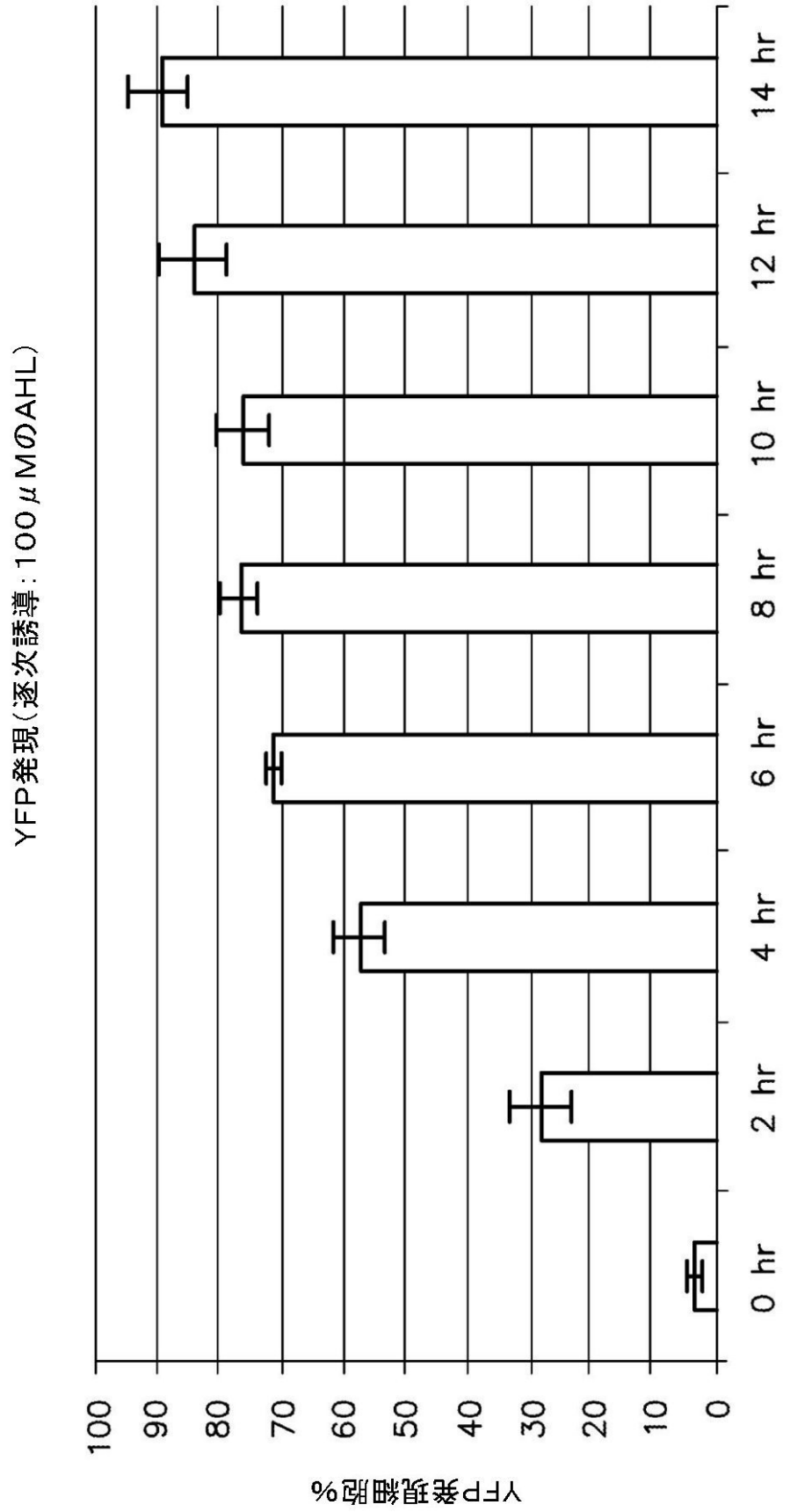

YFP発現（逐次誘導：100μMØAHL）
YFP発現細胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 hr
2 hr
4 hr
6 hr
8 hr
10 hr
12 hr
14 hr

図 41A

【図４１Ｂ】

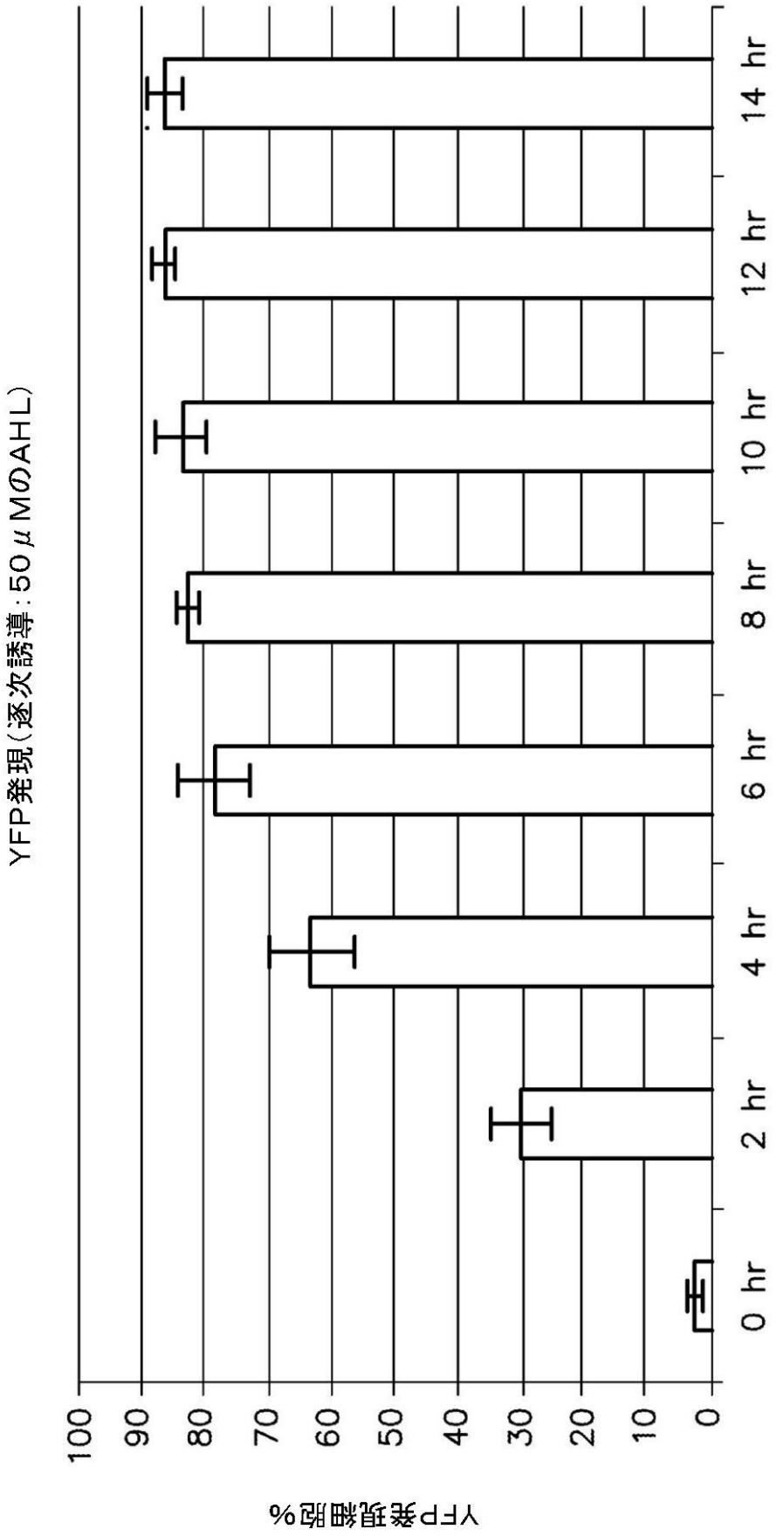

YFP発現（逐次誘導：50μMのAHL）
YFP発現細胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 hr
2 hr
4 hr
6 hr
8 hr
10 hr
12 hr
14 hr

図 41B

【図４１Ｃ】

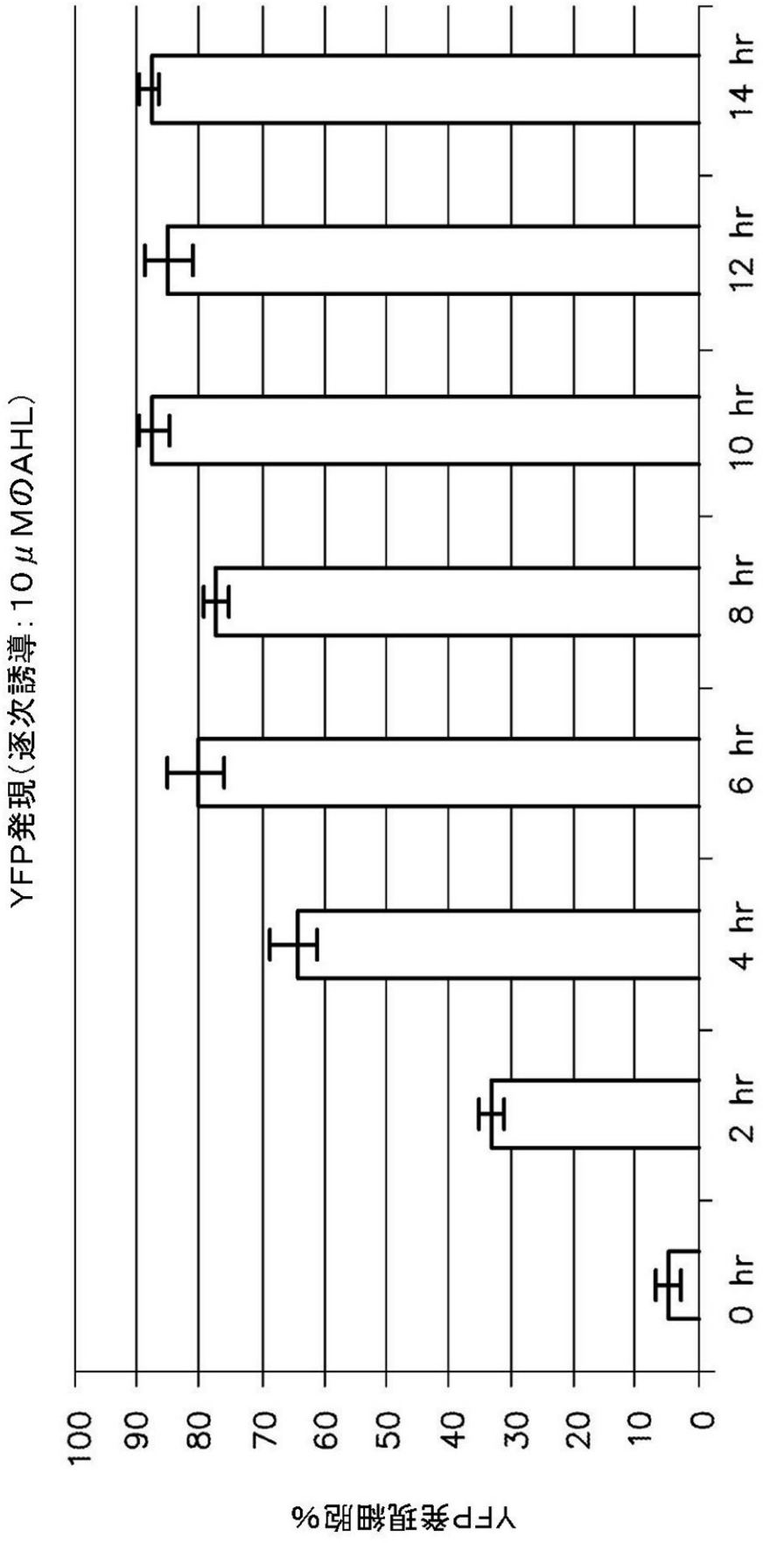

YFP発現(逐次誘導:10μMØAHL)
YFP発現細胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 hr
2 hr
4 hr
6 hr
8 hr
10 hr
12 hr
14 hr

図 41C

【図４１Ｄ】

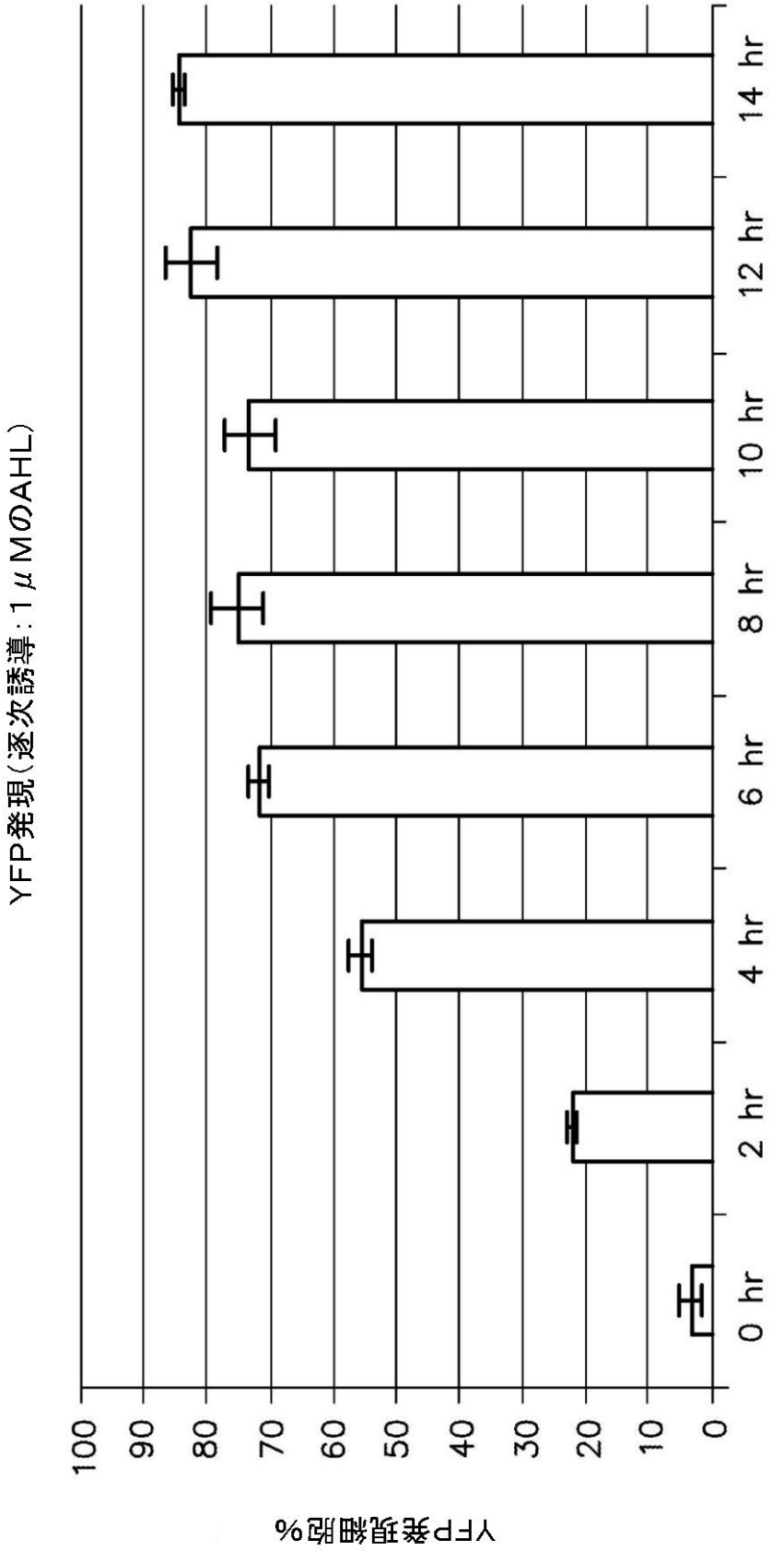

YFP発現（逐次誘導：1μMのAHL）
YFP発現細胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 hr
2 hr
4 hr
6 hr
8 hr
10 hr
12 hr
14 hr

図 41D

【図４１Ｅ】

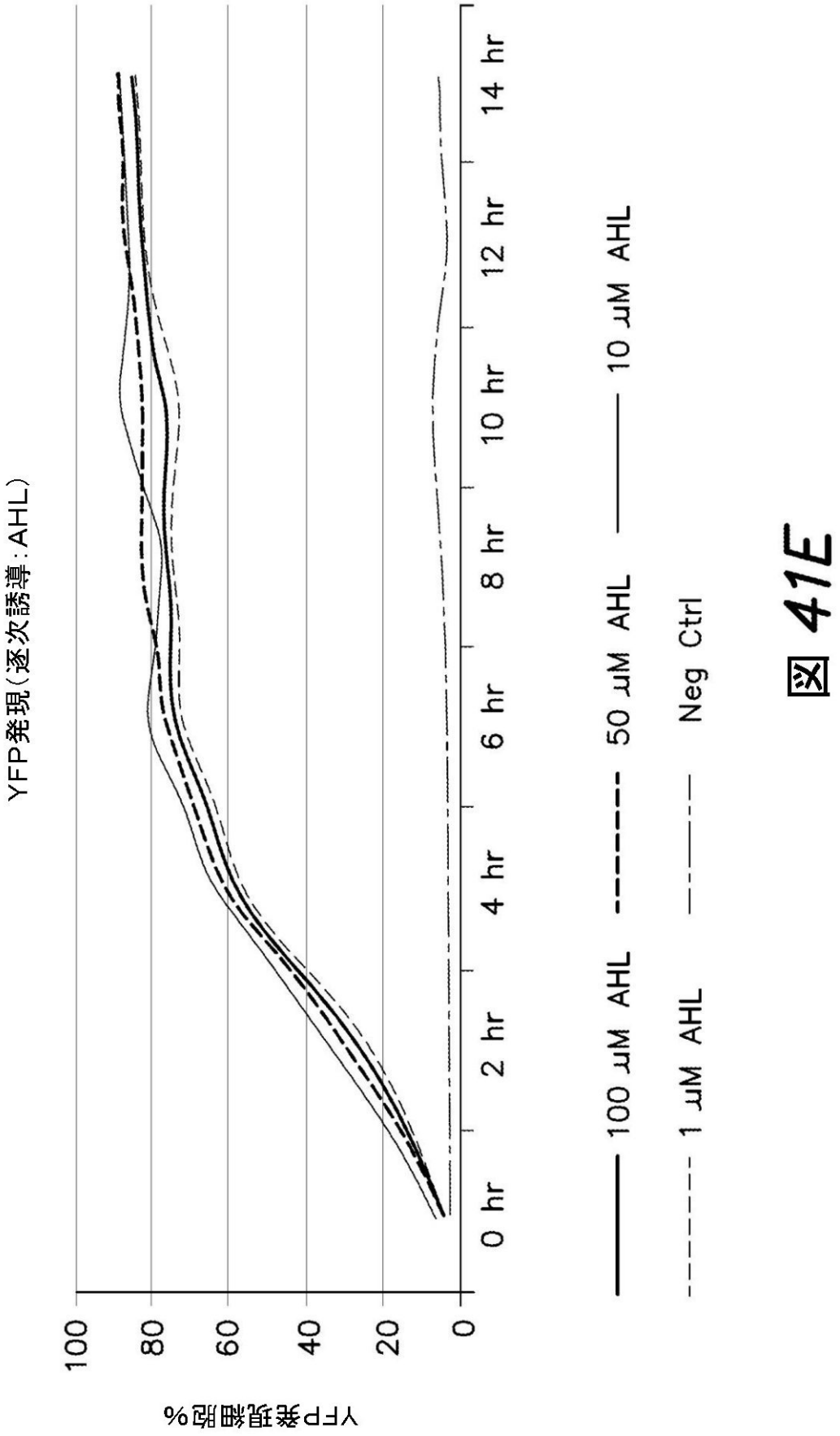


図 41E

【配列表】

2016505959000001.app

【国際調査報告】

ERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/075068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G06N3/12 C12N15/09 C12N15/63
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G06N C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/075441 A1 (UNIV BOSTON [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; COLLINS JAMES J) 1 July 2010 (2010-07-01) in particular see pages 3-4,7-10, 12-15, 22-23, claims 1, 16,35, 65-68; the whole document ----- -/--	1-3

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 March 2014	25/03/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Vix, Olivier

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

ERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/075068

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. BONNET ET AL: "Rewritable digital data storage in live cells via engineered control of recombination directionality", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 23, 5 June 2012 (2012-06-05) , pages 8884-8889, XP055082605, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1202344109 cited in the application in particular see abstract, page 8885-8887; the whole document	1-25
Y	YAAKOV BENENSON: "Biomolecular computing systems: principles, progress and potential", NATURE REVIEWS GENETICS, vol. 13, no. 7, 12 June 2012 (2012-06-12), pages 455-468, XP055107191, ISSN: 1471-0056, DOI: 10.1038/nrg3197 in particular see abstract and pages 456-457, figure 2-3 and 4and page 463-464; the whole document	1-25
Y	FRIEDLAND ARI E ET AL: "Synthetic gene networks that count", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 324, no. 5931, 29 May 2009 (2009-05-29), pages 1199-1202, XP002575081, ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	1-25
Y	SERGI REGOT ET AL: "Distributed biological computation with multicellular engineered networks", NATURE, vol. 469, no. 7329, 13 January 2011 (2011-01-13), pages 207-211, XP055106696, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature09679 cited in the application see page 207-209; the whole document	1-25

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

ERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/075068

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALVIN TAMSIR ET AL: "Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical 'wires'", NATURE, vol. 469, no. 7329, 13 January 2011 (2011-01-13), pages 212-215, XP055065330, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature09565 cited in the application in particular see abstract , page 212 and figures 3-4; the whole document	1-25
Y	C. M. AJO-FRANKLIN ET AL: "Rational design of memory in eukaryotic cells", GENES & DEVELOPMENT, vol. 21, no. 18, 15 September 2007 (2007-09-15), pages 2271-2276, XP055106701, ISSN: 0890-9369, DOI: 10.1101/gad.1586107 cited in the application see page 2271--73	1-25
Y	DEVIN R. BURRILL ET AL: "Making Cellular Memories", CELL, vol. 140, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 13-18, XP055107071, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.034 page 13-14 and 16	1-25
Y	TIMOTHY S. HAM ET AL: "Design and Construction of a Double Inversion Recombination Switch for Heritable Sequential Genetic Memory", PLOS ONE, vol. 3, no. 7, 1 July 2008 (2008-07-01), page e2815, XP055107381, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0002815 cited in the application e2815 pages 3-7	1
Y	TOM ELLIS ET AL: "Diversity-based, model-guided construction of synthetic gene networks with predicted functions", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 27, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 465-471, XP055107449, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1536 465 and 467-468	1-25

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

ERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/075068

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	WO 2013/169867 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; BONNET JEROME CEDRIC [US]; SUBSOONTO) 14 November 2013 (2013-11-14) the whole document -----	1-25
Y,P	MARIO A MARCHISIO: "In silico design and in vivo implementation of yeast gene Boolean gates", JOURNAL OF BIOLOGICAL ENGINEERING, vol. 8, no. 1, 1 January 2014 (2014-01-01) , page 6, XP055106697, ISSN: 1754-1611, DOI: 10.1038/nmeth1083 the whole document -----	1-25
Y,P	BRYNNE C STANTON ET AL: "Genomic mining of prokaryotic repressors for orthogonal logic gates", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 10, no. 2, 1 February 2014 (2014-02-01), pages 99-105, XP055106747, ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/nchembio.1411 the whole document -----	1-25

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

ERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2013/075068

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010075441 A1	01-07-2010	US 2012003630 A1 WO 2010075441 A1	05-01-2012 01-07-2010
WO 2013169867 A1	14-11-2013	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ
Ｃ１２Ｎ　9/00	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/00	

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者　シウティ，ピロ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３９、ケンブリッジ、リー　ストリート　４０、アパートメント　２アール

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA11 AA20 BA07 CA02 CA09 DA06 EA04 FA02 GA11 HA01
4B050 CC04 DD20 EE10 LL01 LL03
4B065 AA26X AA99Y AB01 AC14 BA02 CA27 CA44 CA46 CA60