

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K04549

研究課題名（和文）信頼性の低い分子部品から信頼性の高いDNA回路を創るための基礎論と設計法

研究課題名（英文）Theory and methods for designing reliable DNA circuits by assembling unreliable molecular reactions

研究代表者

中茎 隆（Nakakuki, Takashi）

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：30435664

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らによって過去に構築された基礎理論「Finite-time regulation property」を発展させ、DNA反応系を2つの時間スケールモデルに変換し、DNA回路の動特性を制御工学における周波数応答解析にて評価する解析法を確立した。また、光応答性分子アゾベンゼンを用いて、DNAフィードバック制御回路を長時間駆動する方法も確立した。広く当該分野の魅力を社会に発信すべく、英語書籍「Molecular Robotics」の反応系設計に関する章の取りまとめと執筆（分担）を行い、体系的に当該分野における技術状況をまとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子で構成される分子ロボットは、様々な要素技術が統合された知的システムである。医療分野での応用が期待されている分子ロボットを実用化へと進展させる上で、高機能なDNA制御回路の実現が求められている。DNA回路の実態は化学反応系であり、その構成分子であるDNA鎖が分子部品となる。本研究では、DNA回路という高次非線形系に対して、特異摂動理論に基づく実用的な解析法を提案しており、制御理論の新たな拡張性を示唆している。また、分子ロボットの制御に必要なDNAフィードバック制御器を長時間駆動する設計法の確立は、分子ロボットの社会実装を進める上で必要不可欠となる技術である。

研究成果の概要（英文）：We successfully applied the basic theory of “finite-time regulation property,” which had been established in our previous study, to practical DNA circuits. Especially, we proposed the new method to evaluate the dynamic properties of DNA circuits, based on the frequency response analysis in control engineering. We also established a practical method to drive the DNA feedback regulator for a long time by using a photo-responsive molecule, azobenzene. As an outreach of molecular robotics, we have compiled and written a chapter on the design theory of DNA circuits in the English book “Molecular Robotics” from the perspective of control theory.

研究分野：制御理論

キーワード：分子ロボティクス

1. 研究開始当初の背景

- 全く新しい制御対象「分子ロボット」の出現
新学術領域研究「分子ロボティクス」(2012~2016年度)では、DNA ナノテクとロボット工学を融合することで実現が可能となる分子ロボットの開発が進められた。分子ロボットは、フレームとなるカプセル、感覚を担うセンサ、運動を作るアクチュエータ、センサからの情報とアクチュエータの運動を結びつける制御系で構成される。現在、血管内を循環する1型糖尿病患者向けの人工膵島細胞型分子ロボットの研究開発が活発に行われている^[1]。特に、分子ロボットの機能性に直結する制御系設計問題は、中核をなす研究課題となっている。
- 分子ロボットの制御系 = 化学反応系 (高次元非線形系)
分子ロボットでは、センサからの出力やアクチュエータへの入力、DNA 鎖 (高分子物質) を介して行われる。分子ロボットの制御系では、DNA 鎖の濃度量が信号成分となり、制御則は、DNA 鎖の化学反応系 (以後、DNA 回路と呼ぶ) 上に実装される必要がある。すなわち、「制御系の設計問題」は、「化学反応系の設計問題」に帰着される。ここで問題となるのが、一般に高次元非線形系である化学反応系を、制御理論の観点から解析する手法、並びに、自在に操る制御法が十分に整備されていない点である。
- DNA 回路が抱える根源的な問題 = 分子部品 (DNA 鎖) の信頼性が低い
DNA 回路では、その構成要素である DNA 鎖が分子部品となる。近年のナノテクノロジーの発展により、DNA 鎖の分子構造は、正確に設計可能である。この技術を用いて、分子間反応の順序と組合せを巧みに管制することで、理論上、所望の機能を創発する化学反応系を設計することができる^[2]。一方で、各々の DNA 鎖の分子構造は正確に設計できても、分子間反応の熱力学的ゆらぎに起因する設計者が望まない副反応を防ぐことはできない。すなわち、DNA 鎖は、回路設計の分子部品という観点では信頼性が低い。これまで、DNA 回路による論理・数値演算など、様々な設計事例が報告されてきた。しかし、分子部品の信頼性の低さがボトルネックとなり、実験的に検証された研究成果は、小規模で単純な機能 (AND、OR、加算器など) を持つ DNA 回路に限定される。

[1] 小長谷明彦, 分子ロボットが拓く未来の創薬, MDB 技術予測レポート, 2050 未来・世界を変える技術, 日本能率協会総合研究所, 2019.

[2] D. Soloveichik, et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 5393-5398, 2010.

2. 研究の目的

本研究では、(1) 信頼性の低い分子部品から信頼性の高い DNA 回路を設計するための基礎論を確立し、(2) 分子ロボットに搭載可能な高機能な制御回路を設計する。特に、設計法に対しては、実験的に実装可能な技術を見据えて提案する。

高機能な制御回路を設計することは、多種の分子部品を組み合わせた複雑な DNA 回路を設計することを意味する。副反応は DNA 回路の規模と共に爆発的に増加し、DNA 回路の機能不全を引き起こす。「高機能な制御回路」を設計するためには、「信頼性の高い DNA 回路」の設計法を確立する必要がある。その前提として、高次元非線形系である DNA 回路の実用的な解析法を確立することが重要である。

3. 研究の方法

(1) 信頼性の低い分子部品から信頼性の高い DNA 回路を設計するための基礎論について：

本テーマとして具体的には、高次元非線形系である DNA 回路の実用的な解析法を確立する。一般に、DNA 回路の設計法は、酵素を利用する反応系設計と酵素を利用しない (酵素フリー) 反応系設計に大別される。本研究では、後者の酵素フリーの枠組みで設計される DNA 回路を解析対象とする。

酵素フリーの DNA 回路は、DNA 鎖置換反応と呼ばれる比較的単純な反応機構を基本単位とし、複数の DNA 鎖置換反応の入出力を直列的・並列的に接続することで設計される。すなわち、DNA 回路は全体として複数の DNA 鎖置換反応の連鎖系となる。個々の DNA 鎖置換反応は、一定量以上の初期濃度を持つ DNA 鎖 (以後、燃料 DNA 鎖) を介して進行し、出力となる DNA 鎖 (以後、シグナル鎖) を生成する。

一般に、DNA 反応系を構成する DNA 鎖の濃度量を状態変数とすることで、反応速度論に基づいて、DNA 回路のダイナミクスは、常微分方程式としてモデル化される。研究代表者らは、DNA 回路を構成する燃料 DNA 鎖とシグナル鎖のダイナミクスの違いに着目し、先行研究において“Finite-time regulation property”という基礎論を構築した^[3]。典型的な設計法に従うと、DNA 回路においては、燃料 DNA 鎖の初期濃度は、シグナル鎖の初期濃度より高い濃度に設定されるが、文献^[3]では、燃料 DNA 鎖に対応する

状態変数を“遅いモード”，シグナル DNA 鎖に対応する状態変数を“速いモード”とすることで，2時間スケールモデルに変換できることが提唱された。本テーマでは，2時間スケールモデル変換を利用しつつ，制御理論における周波数応答解析を融合した新たな DNA 回路の解析手法を構築する。

(2) 分子ロボットに搭載可能な高機能な制御回路の設計：

本テーマとして具体的には，長時間駆動可能な DNA フィードバックレギュレータの設計法を提案する。DNA フィードバックレギュレータとは，特定の DNA 鎖（主に，制御対象の出力 DNA 鎖）の濃度を所望の濃度レベルに調節・維持する DNA 回路である[3]。近年，DNA フィードバックレギュレータの設計法が DNA コンピューティング分野で活発に研究されている（研究事例は文献[3]の Introduction を参照のこと）。一方で，現在のところ2つの課題が残されている。

DNA フィードバックレギュレータの稼働時間が短い：上記(1)で述べたように，DNA 回路の駆動には燃料 DNA 鎖が必要となるが，シグナル鎖を生成するために急激に消費される。その結果，反応ダイナミクスは顕著に影響を受け，例えば，DNA フィードバックレギュレータの場合には，時間の経過とともに制御性能が著しく劣化する。一般に DNA フィードバックレギュレータの動作時間は数時間程度となる。

DNA フィードバックレギュレータの実験検証は達成されていない：様々な DNA フィードバックレギュレータの設計法が提案されているが，いずれもシミュレーションレベルでの動作検証のみがなされており，ウェット実験によって動作検証されたものは，(研究代表者の知る限りにおいては，また，本報告書執筆時点においては)存在しない。

本テーマでは，DNA 反応系をリセット（再利用化）する技術として，光応答性分子アゾベンゼンを用いた光反応制御を利用して，DNA 回路の長時間駆動への応用を行う。また，DNA フィードバックレギュレータとして，実験的に実装可能なレベルにまで単純化した反応機構を考案する。

[3] T. Nakakuki, et. al., Finite-time regulation property of DNA feedback regulator, *Automatica*, 114, 108826, 2020.

4. 研究成果

(1) 高次元非線形系である DNA 回路の実用的な解析法：

酵素フリーの DNA 回路に対して，文献[3]で提案された2時間スケール変換を施すことで，状態変数を遅いモードと速いモードに分離することができる。本研究では，DNA 回路の“機能”は速いモード，すなわち，シグナル鎖の濃度変化によって体現されていることに着目し，“DNA 回路の解析”を“境界層モデルの解析”に帰着させる方法論を考案した。さらに，前述のように DNA 回路のダイナミクスは高次元非線形系となるが，特異的・例外的な設計を除く多くの DNA 回路において，境界層モデルは線形システムなるため，線形制御理論が適用可能となる。ただし，燃料 DNA が消費すると，シグナル鎖との濃度差が減少し，2時間スケールモデルへの変換特性も時間と共に劣化する。従って，“境界層モデルの解析”によって得られる動特性，すなわち，回路機能特性は，基本的に過渡状態における回路性能の解析となることに注意されたい。

本解析法を用いることで，様々な DNA 回路の過渡状態における回路性能の解析が可能となる。例えば，増幅回路の一種である seesaw gate に対して本手法を適用することで，過渡状態において，2重積分器として機能することが明らかとなった[4]。また，研究成果[4]では，DNA 論理回路の組み合わせ回路に対しても適用例を示している。本解析手法は，線形制御理論に基づくため，大規模な DNA 回路に対しても適用可能である。

(2) 実験的に実装可能で長時間駆動可能な DNA フィードバックレギュレータ：

一般に，DNA フィードバックレギュレータが「制御器」としての機能を発現する時間は，燃料 DNA 鎖の濃度が反応場に必要十分量残存する時間に限られる。この機能発現の有限性は不可避の課題であり，技術的に解決は困難である。そこで，本研究では発想の転換を行い，“回路の長時間駆動”を“回路の逐次的な再生化”の問題に帰着させる方法論を考案した。具体的には，光応答性分子アゾベンゼンを所定の DNA 鎖に組み込み，適当なタイミングで反応場に紫外線照射を施すことで，DNA フィードバックレギュレータを初期状態にリセットすることができる。その結果，燃料 DNA 鎖は初期濃度に回復するため，リセット後の回路機能も回復する。そこで，紫外線照射を一定時間間隔で繰り返すことで，DNA フィードバックレギュレータの動作を継続的に維持することが可能となる。ただし，リセット時の紫外線照射期間は，回路は初期化モードとして動作するため，制御器としての機能は一時的に失われる。

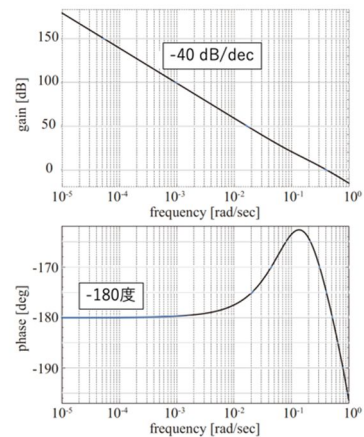


図1. seesaw gateに対する適用結果

本提案手法が適用可能な制御対象としては、一時的に制御不能な時間帯が断続的に存在しても、出力応答への影響が少ないシステムに限られる。ただし、一般に DNA 反応系のダイナミクスは遅いため、制御回路のリセット状態が、制御対象の出力に与える影響は限定的と期待できる[5]。本手法を用いることで、理論上は永続的に DNA フィードバックレギュレータを駆動することができるため、実応用に向けて大きな進展と考えている。また、研究成果[5]では、長時間駆動の方法論に加えて、実験的に実装可能なレベルまで単純化した DNA 回路設計法を提案している。

[4] K. Koga, T. Nakakuki, New Approach to Frequency Response Analysis of Biomolecular Circuits, *SICE Annual Conference (SICE 2021)*, Sep, Tokyo, 2021.

[5] T. Nakakuki, et. al., DNA Concentration Regulator That can be Driven for a Long Time, *New Generation Computing*, 40, 681-702, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murata Satoshi, Toyota Taro, Nomura Shin ichiro M., Nakakuki Takashi, Kuzuya Akinori	4. 巻 32
2. 論文標題 Molecular Cybernetics: Challenges toward Cellular Chemical Artificial Intelligence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2201866 ~ 2201866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adfm.202201866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masaaki Tamba, Keiji Murayama, Hiroyuki Asanuma, Takashi Nakakuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Renewable DNA Proportional-Integral Controller with Photoresponsive Molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 193 ~ 193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi13020193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Keitaro Koga, Takashi Nakakuki	4. 巻 -
2. 論文標題 New Approach to Frequency Response Analysis of Biomolecular Circuits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 2021 60th Annual Conference of the Society of Instrument and Control Engineers of Japan (SICE2021)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takashi Nakakuki, Keiji Murayama, Hiroyuki Asanuma	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA concentration regulator that can be driven for a long time	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Generation Computing	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaaki Tamba, Takashi Nakakuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Renewable implementation of rational biomolecular systems design	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of SICE Annual Conference (SICE2020)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23919/SICE48898.2020.9240329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川野隆宏, 麻生かおり, 嶋田直彦, 丸山厚, 中茎隆
2. 発表標題 分子ブースターによる DNA 鎖置換反応の加速効果の定量評価
3. 学会等名 計測自動制御学会 システム・情報部門 学術講演会 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中茎隆
2. 発表標題 条件反射を獲得する分子反応回路の設計
3. 学会等名 細胞を創る研究会14.0 (CellSynth14) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丹波正明, 中茎隆
2. 発表標題 光応答性分子アゾベンゼンを利用した再利用可能な可能なDNA回路の設計法
3. 学会等名 第4回分子ロボティクス年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋田実, 中荃隆
2. 発表標題 光反応制御を用いた濃度レギュレータに関する研究
3. 学会等名 第4 回分子ロボティクス年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takashi Nakakui (Editor: Satoshi Murata)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 296
3. 書名 Design Theory of Molecular Robots in Book "Molecular Robotics"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------