

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21810004

研究課題名（和文） 生化学ネットワークを用いたバイオコンピューティング

研究課題名（英文） Computing with in vitro biochemical networks

研究代表者

ロンドレーズ ヤニック (RONDELEZ YANNICK)

東京大学・生産技術研究所・特任准教授

研究者番号：10548770

研究成果の概要（和文）：生きている有機体は化学反応連鎖が作り出す高度なネットワークにより、複雑な挙動を発揮する。この生体内化学反応システム概念はまさに生物学の核心であるが、非生物として人工的にこのような構造を作り出すことは極めて難しい。ここではそのような生化学反応システムを任意に構成できるような最小ユニットを作製するために分子生物学の生体外化学反応の標準的な手法を用いて効率的な化学反応振動子を組み立てた。化学反応振動子に対応するネットワークをもつように、20個程度の塩基からなるDNA鋳型をエンコードし、そしてDNA合成量の発振現象を得た。この結果は、簡便なモジュールの連鎖反応を用いることで、人工的に生体の複雑な挙動を論理的かつ予測可能な形で再現できる可能性があることを示している。

研究成果の概要（英文）：Living organisms perform and control complex behaviors by using webs of chemical reactions organized in precise networks. This powerful system concept is at the very core of biology, but it is extremely difficult to rationally create such architectures in artificial, non-living systems. Here we use standard in vitro reactions from molecular biology to describe a toolkit for such a purpose. This approach is demonstrated by assembling an efficient chemical oscillator: we encode the wiring of the corresponding network in the sequence of small DNA templates, and obtain the predicted dynamics. Our results show that the cascading of simple modules opens the possibility to rationally and predictably implement complex behaviors in vitro.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：マイクロバイオシステム

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：DNAコンピュータ, DNA増幅反応, 生化学ネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

生体は分子化学反応ネットワークという生体ならではの特徴的な高度反応ネットワークを用いて、生存のために必要なさまざま

な情報を処理し、極めて複雑な機能を果たしていることが知られている。例えば、遺伝子制御ネットワークは体内時計、記憶、環境の変化による重要な意思決定などの機能を担

う、非常に重要な分子化学反応ネットの一つである。こういった機能は遺伝子が相互に影響、制御し合うことによって発揮されると考えられているが、未だ明らかとなっていない部分も多く、その工学的な応用も進んでいないのが現状である。このような生物学的な化学反応ネットワークは、意味を持たない配列をもった DNA を用いて生体外で再構成できる可能性があり、魅力的なモデルであると考えられる。本研究ではこのような分子化学反応ネットワークに注目し、DNA 増幅反応などの分子エンジニアリング技術を応用してその解明や工学応用を目指している。

## 2. 研究の目的

本研究では、振動子、論理ゲートやトグルスイッチなどの、論理回路や電子回路によく見られる複雑な挙動をもった生体外変遷システムを構築するために、それに必要な生体分子をベースにした分子ツール群を構築することを目的としている。その計画および実際の研究手順を図 1 に示している。具体的には、材料としては DNA 分子を使って、基礎技術としては DNA 増幅反応を応用することによって、実際に振動子、論理ゲート、トグルスイッチといった機構をチューブの中で人工的に構築する。

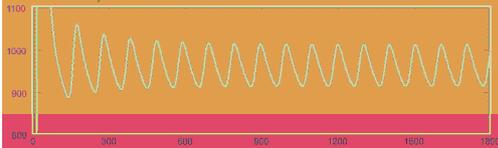
### 1. target a dynamic behavior      2. select a cross-stem topology



### 3. Design the corresponding DNA sequences

T1 = A\***A**\*CAGACTCGA-AACAGACTCGA  
 T2 = T\***G**\*ATGACTCAG-AACAGACTCGA  
 T3 = T\***T**\*ACTCGAAACAGACT-TGATGACTCAG

### 4. Build a predictive model



### 5. Run the experiment

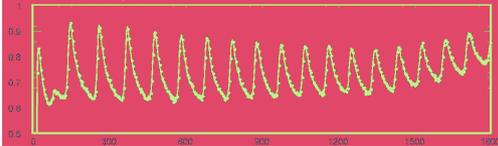


図 1 DNA を用いたネットワークのエンコードの作業手順。ここでは DNA 合成量が発振するような化学振動子の作製手順について示している。まず、「1. 変遷挙動の決定」を行い、次に「2. 一致するトポロジーの選択」を行う。つづいて「3. 一致する DNA 配列の設計」をして、解析計算を行うことで「4. 予測モデルの構築」を行い、最後に実際に実験系を構築して「5. 実験の実施」を行う。

## 3. 研究の方法

本研究のシステムにおいては、蛍光でラベルした、対になった DNA 鎖を使って化学反応ネットワークを作製し、蛍光観察によって起きている現象を確認する。伝達信号となる DNA オリゴマーを交換することにより、DNA 鋳型は互いに相互作用し、計算的機能をもったシステムを作ることができる。また逆に、DNA 分解酵素である DNA スクレアーゼを導入することにより、DNA 量の発散が生じないループ構造をもつネットワークとして構築することも可能になる。化学振動子を構築するために用いた全ての反応ネットワークを図 2 に示す。

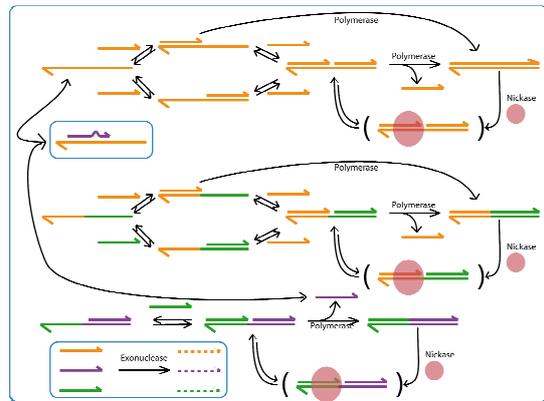


図 2 化学振動子の機能を体現する化学反応ネットワークの概要

本研究で作製したシステムは、相互作用の活性化と抑制、有限な信号伝達の存続時間、自由なネットワークトポロジー再構成など遺伝子制御ネットワークの本質的な特徴を再現することができる、機能的かつユニークなシステムとなっている。

## 4. 研究成果

研究の第一段階として、生体機能に似た特性をもつネットワークの生化学反応ユニットを作製した。

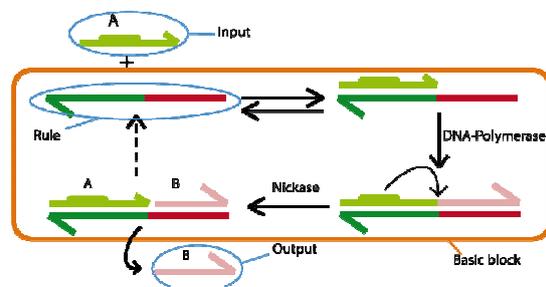


図 3 ポリメラーゼとニックラーゼによる DNA 増幅を基にした基本システムの構成

ここでは DNA と DNA の形質変換の際の反応

制御という構造的特性の利用をしている。20 個程度の塩基からなる DNA 鋳型を用いた DNA 増幅反応とヌクレアーゼによる DNA 分解反応を組み合わせることによって、ループ構造をもつ化学反応ネットワークの作製に成功した。

さらに、本研究で作製したネットワークは、相互作用の活性化と抑制、有限な信号伝達の存続時間、自由なネットワークトポロジー再構成など遺伝子制御ネットワークの本質的な特徴を再現しており、生体分子反応ネットワーク研究の基盤技術となるツールになると期待できる。

最後に、複雑なネットワークを構築することのできる化学反応系として、化学振動子の作製にトライした。ある反応ユニットからの信号によって他方の反応ユニットの機能を抑制する、あるいは鈍化させるという化学反応ネットワークを構築する必要があるが、そのために 3' 末端付近に不適性塩基対を持ったオリゴヌクレオチドを生成するような反応ユニットを作ることによって解決した。また、反応系をダイナミックに維持するためには、ヌクレオチドが選択的に破壊され、反応系が初期状態に戻るといったプロセスも実現する必要があるが、それには選択的エクソヌクレアーゼによって実現することができるはずであり、そのためには DNA 増幅時における温度上昇に対してそれらを安定化させるという工夫が必要である。最後に、実際に双安定スイッチと論理ゲートというネットワークの構築を試み、その実証に成功した。

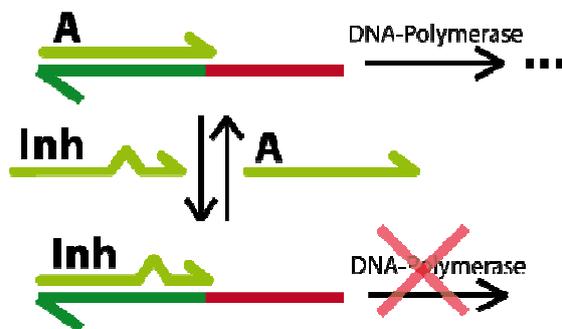


図4 システム中の抑制メカニズム

今後の計画として、図5に示したトグルスイッチのように二つの安定な状態を行き来できるシステムを構築することを検討している。また、8つの異なる DNA 鋳型を用いてネットワークを構成することで記憶を模倣したシステムの構築を目指している。

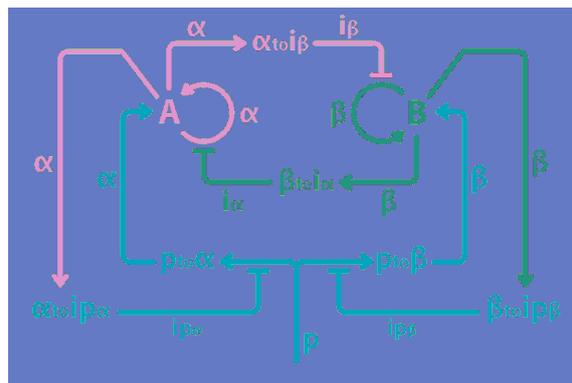


図5 トグルスイッチを示す分子ネットワーク

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① K. Montagne, R. Plasjon, Y. Sakai, T. Fujii, Y. Rondelez, Programming an in vitro DNA oscillator using a molecular networking strategy, Molecular Systems Biology, 査読有, Vol. 7, 2011, 466

[学会発表] (計2件)

- ① S. H. Kim, Y. Rondelez, S. Takeuchi, S. Yoshizawa, D. Fourmy, T. Fujii, Microchamber array for cell-free protein synthesis from single DNA molecules, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010年12月17日, Hawaii, USA
- ② S. H. Kim, T. Yamamoto, Y. Rondelez, D. Fourmy, T. Fujii, Electro-active microwell array for trapping and lysing single, 13th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (MicroTAS2009), 2009年11月4日, 済州, 韓国

[その他]

ホームページ

[http://limmshp.iis.u-tokyo.ac.jp/mediawiki/index.php/Yannick\\_RONDELEZ,\\_Dr.](http://limmshp.iis.u-tokyo.ac.jp/mediawiki/index.php/Yannick_RONDELEZ,_Dr.)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

ロンドレーズ ヤニック (RONDELEZ YANNICK)

東京大学・生産技術研究所・特任准教授

研究者番号：10548770

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし