**Design**

**Polymerase reaction**

　私たちは、細胞内のATPを吸収する手段としてポリメラーゼ反応を利用します。ポリメラーゼとは、DNAやRNAのような核酸ポリマーや長鎖を合成する酵素です。本研究では、T7プロモーター配列を含む二本鎖を鋳型、NTP（ヌクレオシド３リン酸）を基質として、プロモーター下流の鋳型DNAに相補的な一本鎖RNAを合成する酵素である、T7RNAポリメラーゼを用います（図1、動画）。

**ON-OFFシーケンサ**

**１、About ON-OFFシーケンサ**

　私たちは、図2のようにプロモータ下流にアデニンを羅列することで、ATPのみをエネルギーとして吸収する様に設計しました。さらに、私たちは以下のいずれかのシステムを実装しようと考えました。

・増幅ゲート

細胞の働きを完全に止めるには大量の濃度のDNAが必要になります。増幅ゲートを実装すれば、大量のATPをもつ細胞でも殺すことができます。

・ON-OFFスイッチ

T7RNAポリメラーゼは、１のような２本鎖を認識し、反応を始めます。そこで、図３(a)のような２本鎖状態をON状態とし、(b)の１本鎖状態をOFF状態とすることで、ポリメラーゼ反応のONとOFFを切り替えることが出来ます。

・フィードバックレギュレータ

　ATPの過剰発現による病気も存在します。フィードバックレギュレータを実装すればATPの濃度を一定に保つことができ、完全に細胞を殺す以外にも応用の幅が広がります。

私たちのプロジェクトの目的は正常細胞には悪影響を与えないという事なので、今回はON-OFFスイッチを実装します。これにより、我々のシステムによって癌細胞が死ぬタイミングで正常細胞内のものはOFFになり、必要以上に負担を与えません。ON-OFFスイッチ回路のスキームを図4に示します。

（図４）

aとa\*の二本鎖がT7プロモータ配列になっており、bとb\*の2本鎖でATPを消費しながらRNAを合成する様になっています。また、私たちはON-OFF間の時間を制御するために、シーソーゲートを用いました。シーソーゲートとは、図の様な演算素子をDNA分子反応で実現したものです。これは、予め設定した閾値を超える入力に対しての出力を生成されますが、その処理には遅れが生じます。私たちはその遅れをON→OFFの間の時間調節に利用できると考え、シーソーゲートを実装しました。図４の右側部分がシーソーゲートです。（シミュレーションはDry Experimentで、利点等についてはDiscussionで述べています。）

（日野、片渕）

　しかし、図4のスキームの時点では２つの問題点があります。１つは、回路が起動する上で望まない反応を起こしてしまうことです。例として、InputとTemplateについて説明します。InputとTemplateの塩基配列は１部相補になっているため、Input投与後にこれらがハイブリを起こす可能性が考えられます。これらがハイブリダイゼーションを行うようにするためにはドメインを変える必要がありますが、Inputに対応してSignal1やGate1\_underのドメインも変えなれければならないため、原理的に不可能になっています。このままの回路では以下の３つの望まない反応経路を取るでしょう。

1. InputとTemplateが結合
2. Signal1とSignal2が結合
3. InputとGate2が結合

もう１つの問題点は、いくつかの二本鎖DNAがT7RNAプローモーター配列を形成し、ON状態以外でもポリメラーゼ反応を起こしてしまうことです（図）。

これらの問題を解決するために、私たちはミスマッチ塩基対を利用しました。

**２、What is mismatch**

(DNAをデザインする際、DNAの挙動を正確に予測し、意図した通りに塩基配列を設計する必要があります。しかし、システムが複雑になればなるほど、DNAが意図しない挙動をとってしまうことがあります。現在では主にそれを軽減するために、バルジループやヘアピンループなど、特殊な２次構造を利用する手法が使われています（図）。しかし、私たちはこれらの手法には利点がある反面、欠点もあると考えます。例えばバルジループの場合、バルジ部分の塩基配列が長くなるほど２次構造が不安定になる、といったことが挙げられます。私たちは新しい手法であるミスマッチ塩基対を用いてDNAの意図しない挙動を軽減します。) ⇨Discussionで書く

DNA塩基のAとT、CとGがそれぞれ水素結合することをワトソンクリック塩基対と呼びますが、DNAはそれらの組み合わせ以外にも結合を行うことが報告されています。これをミスマッチ塩基対と呼びます。ミスマッチ塩基対はワトソンクリック塩基対と比べて結合力は弱いのですが、その中でもG-T結合は結合力が強くなっています。以下にミスマッチ塩基対を用いた例を示します。表の塩基配列は(A)完全相補の２本鎖DNA(B)4箇所にC-A結合のミスマッチ塩基対を含んだ２本鎖DNA(C)４箇所にG-T結合のミスマッチを含んだ２本鎖DNAを示しています。これらの塩基配列は２本鎖DNAを形成するかどうかをDNAの構造確認ソフトNUPACKを用いて、その構造を確認した結果を図に示します。図より、G-T部分は結合しているのに対して、C-A部分は結合していないのがわかります。

**３、Use of mismatch**

　図４をご覧ください。２本鎖を形成したいDNA(A)(B)の塩基配列にG-Tミスマッチを含めた時、(A)と完全相補なDNA(C)と、(B)と完全相補な(D)ではC-Aミスマッチが作られます。つまり、(A)と(B)は結合しますが、(C)と(D)は結合しません。この性質を利用し、図の回路を図の様に改良しました。今回は４箇所にミスマッチ塩基対を加えており、ドメイン名の前に(m1)(m2)(m3)(m4)を加えています。ミスマッチ塩基対を加えたそれぞれの箇所について、NUPACKでの評価を以下に示します。

(m1)InputとTemplate

先ほど述べたように、InputとTemplateは１部相補になっているため、ハイブリダイゼーションを起こします。これに対して以下のようにミスマッチ塩基対を含めた時のNUPACKの結果を図に示します。赤字が望んでいる反応を示しています（以下同様）。

(m2)Signal1とSignal2

同様に、Signal1とSignal2は相補になっているため、ハイブリダイゼーションを起こします。(m1)と違い、これらは完全に結合しなくする必要はなく、Signal1が全てDCCと結合する様にミスマッチを加えました。NUPACKの結果を図に示します。

(m3)InputとGate2

InputとGate2は、トーホールドになっているT3から反応が進んでしまうため、T3にミスマッチを加えました。

(m4) Gate2

Gate2はT7プロモーター配列を含んでいるため、ポリメラーゼ反応が起こります。ここにもミスマッチ塩基対を加え、T7RNAポリメラーゼが認識しない様にしました。

　ミスマッチを加えた、新しいスキーム図を図に示します。これによって、望まない反応が低減することが期待されます。ミスマッチを加えた２本鎖DNAのNUPACKの結合力評価を図に示します。G-T結合のミスマッチ塩基対を含んでいますが、結合力は強く保たれていることが確認できます。また、ミスマッチの追加によって、ON状態以外でのT7RNAプロモータ配列が無くなり、その問題点も解決しています（図）。