

# Hill型の融解曲線を持つDNA塩基配列の設計

池田 亮太<sup>1,a)</sup> 小林 聡<sup>1,b)</sup> 小宮 健<sup>2</sup>

**概要:** 2010年, 2016年の小宮らの研究により, 温度が上昇すると構造の存在確率が大きくなる hill 型の融解曲線を持つ DNA 塩基配列が発見され, 外部からの温度調節によって計算機能や構造を制御できるシステムの構築が期待されている. そこで, 本研究では温度制御可能な特定の DNA スイッチのための配列設計手法を2つ提案した. 手法1では1本みの配列を対象に, 塩基対の存在確率に注目した評価関数を設定し, 確率的局所探索法による最適な DNA 塩基配列の探索を計算機上で行った. しかし, この手法で得られた配列は目的の構造を取り得る温度幅が大きく実用的でないことから, もう一本の配列, 阻害配列を追加して2本の配列を用いた2つ目の探索手法を提案した. この手法は, 特定の温度以外において目的の構造を取るのを邪魔する阻害配列を導入しており, 目的の構造を取る配列の探索, 阻害配列の探索, そして各配列の濃度の設定という3段階から構成される. 探索手法2から得られた配列は, 目的の構造を取る温度幅を手法1に比べて約3分の1まで小さくすることができ, この他の温度制御可能なシステムのための配列設計にも有用である可能性がある. 一方で, 得られた配列が実験で実際に機能するかの検証はできておらず, 未だ実用上の課題が残る.

## 1. はじめに

2010年, 2016年の小宮らの研究 [1], [2] により, 温度が上昇すると構造の存在確率が大きくなるような hill 型の融解曲線を持つ DNA 塩基配列が発見され, 外部からの温度調節によって計算機能や構造を制御できるシステムの構築が期待されている. そこで, 本研究では温度制御可能な DNA スイッチを想定し, そのシステムに必要な DNA 塩基配列の設計手法を提案する.

文献 [2] では, hill 型の融解曲線を持つ双安定なヘアピン構造を設計する方法を提案している. そこでは, 3状態の反応モデルを仮定し, 数理的に解析することによって, ヘアピンループ長やスタック部分の長さを設計するアルゴリズムを与えている. しかしながら, 実際に実験に用いるためには, 予想外の構造形成などを考慮する必要があり, 二次構造解析ソフトウェアを用いて詳細に評価した配列を用意する必要がある. DNA 配列の平衡状態における解析を行えるソフトウェアとしては, NUPACK が知られている ([3]). 本研究では, NUPACK を用いて配列を二次構造レベルで詳細に評価しながら, 目的の機能をもつ DNA 配列を設計する手法を提案する.

## 2. 想定する DNA スイッチ

図1で示すように, 3'末端の配列が自身と二本鎖を形成したヘアピン構造を持つ DNA では, 3'末端の配列が DNA ポリメラーゼによる伸長反応のプライマーとなり, 自身の配列を鋳型にして相補鎖伸長が起こる. ここで, 二本鎖 DNA を切断する制限酵素を用いれば, 相補鎖伸長によって合成された DNA を出力として得ることができる. 3点の温度  $T_1, T_2, T_3$  ( $T_1 < T_2 < T_3$ ) に対して, もし温度  $T_1, T_3$  においてはこのヘアピン構造をとらず, 温度  $T_2$  においてこの構造を取りやすい配列を見つければ, この反応によって, 特定の温度のみに反応する DNA スイッチに利用できる可能性がある.

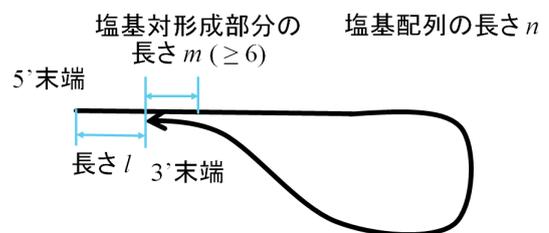


図1 目的の構造

## 3. 提案する配列設計手法

本研究では, NUPACK を用いて平衡状態の解析を行いながら, hill 型の存在確率曲線をもつ DNA スイッチ (2 節)

<sup>1</sup> 電気通信大学 大学院情報理工学研究科

<sup>2</sup> 東京工業大学 情報理工学院

<sup>a)</sup> i1931008@edu.cc.uec.ac.jp

<sup>b)</sup> kobayashi.satoshi@uec.ac.jp

を実現する DNA 配列を探索するシステムを作成した。1本の配列で DNA スイッチを構成する設計手法と、2本の配列で DNA スイッチを構成する設計手法を考案し、その有用性に関する分析を行った。

### 3.1 1本の配列による設計 (設計手法 1)

確率的局所探索法を用い、入力として配列の 5' 末端から 3' 末端が会合する部位までの長さ  $l$ , 3 点の温度  $T_1, T_2, T_3 (T_1 < T_2 < T_3)$  を与え、ランダムな初期解から近傍を適当に定義された目的関数により評価し、解を更新していく。温度  $T_2$  において図 1 のような構造を取りやすく、温度  $T_1, T_3$  において 3' 末端の 3 塩基が他塩基と会合することを避けたい。したがって、目的関数としては、以下の 3 点を組みこんだ。

- 温度  $T_2$  で 3' 末端が指定した塩基と形成する塩基対の存在確率の和
- 温度  $T_2$  で 3' 末端からの 3 塩基が指定した塩基以外と塩基対を形成する確率の和
- 温度  $T_1$  と  $T_3$  で 3' 末端からの 3 塩基が塩基対を形成する確率の和

探索空間が広く、また局所解に陥りやすいと考えられることから、近傍を探索する回数を 1 回の試行につき 1000 回と設定し、初期解を変更して探索を繰り返した。この手法で 2725 回探索を行い、温度  $T_2$  で目的の構造の存在確率が高くなるような配列を 12 例得ることができた。しかしながら、得られた配列は目的の構造を取る温度幅が大きかったため、実用的ではなかった。そこで、この問題を改善した次の設計手法を提案した。

### 3.2 2本の配列による設計 (設計手法 2)

この設計手法では、2本の配列を用いて DNA スイッチを設計する。探索の全体的な流れは次の 3 段階に分けられる。

1. 目的の配列の設計
2. 阻害配列の設計
3. 2本の配列の適切な濃度の設定

まず、目的の配列の候補を確率的局所探索法を用いて探索する (ステップ 1)。このとき探索するのは、3.1 節のような特定の温度のみにおいて目的の構造をとりやすい配列ではなく、特定の温度付近から急激に目的の構造を取りにくくなるような配列である。この探索を一定回数行い、得られた解の中から上記の特徴を持つ配列を一つ選ぶ。選んだ配列に対して、適切な阻害配列を確率的局所探索法により探索する (ステップ 2)。目的の配列は特定の温度以上になったときに目的の構造を取りにくくなる。そのため、 $T_2$  以下の温度において目的の配列が阻害配列と会合する構造体を多くとるようになれば、 $T_2$  においてのみ目的の構造を得ることが期待できる。この探索も一定回数行い、得られた阻

害配列から一つ選び、最後に、2本の配列に対して適当な濃度を最急降下法により設定する (ステップ 3)。結果が芳しくない場合は、阻害配列の選択まで戻り再び濃度を設定する。

この設計手法を用いて探索を行ったところ、設計手法 1 よりも目的の構造を取る温度幅が狭い配列と濃度の組を多数発見することができた。設計手法 1 で得られた 12 例の配列と設計手法 2 で得られた 15 例の配列と濃度の組により、目的の構造を取る温度幅がどれほど異なるか比較した。

表 1 目的の構造の温度幅

	設計手法 1	設計手法 2
平均	42.7 °C	10.7 °C
最小	31 °C	9 °C
標準偏差	10.4 °C	1.7 °C

表 1 は各融解曲線の半値全幅を調べて比較したものである。設計手法 2の方が安定して、目的の構造の温度幅の小さい配列と濃度の組を発見することができた。

## 4. 結論と今後の方針

ある温度で特定の構造を持つ、温度制御に利用可能な配列を探索するために、2本の配列を用いた設計手法が有効であった。また、1本の配列のみでは設計するのが難しいような、この他の複雑な配列仕様に対してもこの手法が有用である可能性がある。

本研究で得られた配列は計算機上で調べたのみであり、実際に実験による検証ができていない。したがって、実際の温度制御に用いるために、制限酵素の認識部位等の制約を付けた条件で探索を行う必要がある。

また、今後は配列仕様の入力時に、温度ごとに形成させたい、あるいはさせたくない塩基対や、特定の部位に作りた塩基の並び等を指定でき、これに対して適切な目的関数を自動的に設計して探索できるような、汎用的な塩基配列設計システムを考えたい。

### 謝辞

本研究は JSPS 科研費 基盤 B (No. 19H04204) の助成を受けたものです。

### 参考文献

- [1] Komiya K., Yamamura M., Rose J.A.: *Quantitative design and experimental validation for a single-molecule DNA nanodevice transformable among three structural states*, Nucl. Acids Res. (2010).
- [2] John A. Rose, Ken Komiya and Satoshi Kobayashi: *Engineering multistate DNA molecules: a tunable thermal band-pass filter*, IET Micro and Nano Letters (2016).
- [3] Joseph N. Zadeh, Conrad D. Steenberg, Justin S. Bois, Brian R. Wolfe, Marshall B. Pierce, Asif R. Khan, Robert M. Dirks, Niles A. Pierce: *NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems*, Journal of Computational Chemistry (2011).