

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	DNA 液滴の自己複製機能を構成する時間制御された分裂機能と増幅機能の構築
Title(English)	Construction of timing-controlled division and amplification functions for self-replication of DNA droplets
著者(和文)	丸山智也
Author(English)	Tomoya Maruyama
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第240号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:瀧ノ上 正浩,山村 雅幸,上野 隆史,松浦 友亮,藤枝 俊宣
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第240号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	丸山智也		審査員主査： Chief Examiner	瀧ノ上正浩

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

核酸、タンパク質、脂質などの生体分子を組み合わせて作られる人工細胞は、生細胞モデルや分子コンピュータなどを通じて、次世代の医療やコンピュータへの応用が期待されている。人工細胞の用途をさらに広げるためには、生細胞が行う基本的なダイナミクスを人工細胞で実現することが不可欠であり、生命の本質とも言われる「自己複製機能」はその実現が特に求められている。自己複製機能は、構成要素の増幅による成長とタイミング制御された分裂の2つのダイナミクスが連続して起こることによって達成される。しかしながら、増幅機構を人工細胞に実装することの難しさや、成長と分裂を連続して起こすことの難しさから、その実現は未だ困難である。DNA液滴は、Y字型やX字型などの分岐構造を持つDNAナノ構造の自己集合で形成される、流動性のある細胞サイズ(直径数十 μm)の球形の凝集体(液滴)であり、人工細胞としての利用が期待されている。DNA液滴は酵素やオリゴ核酸との反応により、融合、分裂、動きなどの様々なダイナミクスを簡単に起こすという利点を持つ。またDNA分子は増幅が容易なため、DNA液滴に増幅機構を組み込むことは比較的容易であると考えられる。そこで本研究では、DNA液滴ベース人工細胞の自己複製機能の実現を目指し、DNA液滴の時間的に制御された分裂機構、および成長のために必要となる増幅機構の構築に取り組んだ。

初めに、DNA液滴の分裂の時間的制御を行うための分裂タイミング制御機構の構築に取り組んだ。お互いに結合しない2種類のY字型DNAナノ構造体と、両方の粘着末端を持ち、異なるY字型DNAナノ構造体を架橋するリンカーDNAナノ構造体によって形成される融合DNA液滴は、リンカーが切断されることでそれぞれのY字型名の構造体由来のDNA液滴に分裂することが知られている。そこで我々は、リンカーを切断する1本鎖DNA分裂トリガーの生成を時間制御し、リンカーの切断速度を変化させることで融合DNA液滴の分裂タイミング制御を試みた。分裂トリガーの生成を時間制御するため、「時間遅れ回路」を設計した。時間遅れ回路は、(i)分裂トリガー(1本鎖DNA)と阻害RNA(1本鎖RNA)の結合による不活性トリガー(RNA/DNAハイブリッド)の形成、(ii)リボヌクレアーゼH(RNase H)による阻害RNAの分解による不活性トリガーから分裂トリガーの生成、の2つの反応によって構築される。本研究では、阻害RNA濃度およびRNase H濃度の調節によって(i)および(ii)の反応速度を変化させて分裂トリガーの生成速度を制御することで、結果的にDNA液滴の分裂のタイミングが制御できることを示した。さらに、時間遅れ回路を利用してリンカーの切断の順番を切り替えることで、DNA液滴の多段階分裂における分裂経路制御を実現した。3種類のY字型DNAナノ構造体と、それらを架橋する2種類のリンカーによって形成される融合DNA液滴に対して時間遅れ回路を利用し、2種類のリンカーの切断順番を制御した。その結果、3種類のY字型DNAナノ構造体のそれぞれからなる異なる3種類のDNA液滴への多段階分裂において、分裂経路(どの液滴が最初に分裂されるかの順番)を制御することに成功した。また、2種類のリンカーの切断を遅延させるためにそれぞれ利用した阻害RNA濃度の大小によって多段階分裂における分裂経路が切り替わることを利用し、阻害RNAとして用いた乳がんのバイオマーカーであるマイクロRNAの濃度を比較可能な分子コンパレータの構築にも成功した。また、反応拡散シミュレーションを行い、2種類のリンカーの切断され易さの違いが、分子コンパレータの出力である分裂経路が切り替わるときの濃度差に影響していることを予測した。さらに、時間遅れ回路を利用して融合DNA液滴に含まれる2種類のリンカーの切断を段階的に行い、(i)最初のリンカー切断による二相分離液滴の形成、(ii)次のリンカー切断による完全な分裂という多段階ダイナミクスを起こし、1つの液滴が二相分離状態を介して2つの液滴に分裂する細胞のような分裂(細胞様分裂)を実現した。最後に、DNA液滴の成長に必要なDNAナノ構造体の増幅機構の構築に取り組んだ。まず、DNA増幅反応と組み合わせることが可能な新規DNAナノ構造体の設計を行い、それらがDNA増幅反応の至適温度でDNA液滴を安定的に形成することを確認した。さらに、新規DNAナノ構造体を構成するDNAをテンプレートとした等温DNA増幅反応を行い、相補鎖の増幅および相補鎖DNAによるDNAナノ構造体の形成に成功し、DNAナノ構造体増幅機構の構築を実現した。

本研究では、DNA液滴ベース人工細胞の時間的な分裂制御機構とDNAナノ構造体の増幅機構の構築を実現した。自己複製機能を持つDNA液滴ベース人工細胞は、初期生命における重要な現象の解明や、新たなバイオマテリアルの開発に大きく貢献すると考えられる。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命工学 生命工学	系 コース	申請学位(専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	丸山智也		審査員主査： Chief Examiner	瀧ノ上正浩

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Bottom-up artificial cells are expected to be applied to living cell models and molecular computers. To further expand their applications, it is essential to implement the fundamental dynamics of living cells within artificial cells. Particularly, a self-replication function, which is the essence of life, is desired. Recently, DNA droplets, which are micro-sized droplets formed by the self-assembly of DNA nanostructures, have attracted much attention as artificial cells because they easily undergo various dynamics such as fusion, division, and motion. However, a self-replication of DNA droplets has not been achieved yet. Here, we report (i) a timing-controlled division function of DNA droplets and (ii) a construction of a DNA nanostructure amplification system required for growth in DNA droplets to achieve the self-replication of DNA droplets.

First, we designed an enzymatic delayed reaction that produces single-stranded DNA (ssDNA) as a division trigger, inducing the DNA droplet division with a controllable time delay. By tuning the reaction, we successfully controlled the timing of droplet division in both experiments and numerical simulations. Furthermore, regulating expression orders of multiple division triggers resulted in the control over a pathway of droplet division. Moreover, we applied the pathway-controlled division to the molecular computer, which compare miRNA concentration. Finally, we achieved a cell-like division of DNA droplets, which is the division from one droplet into two droplets.

Second, we constructed a DNA nanostructure amplification system for the growth of DNA droplets. First, we designed new DNA nanostructures compatible with an amplification reaction and confirmed that they formed stable DNA droplets. Then, an isothermal amplification reaction amplified the complementary strand of the single-stranded DNA comprising the DNA nanostructures. The amplified strands formed DNA nanostructures, confirming the successful construction of the DNA nanostructure amplification system.

In conclusion, we constructed the timing-controlled division system of DNA droplets and the DNA nanostructure amplification system. Artificial cells based on DNA droplets with self-replication functions are expected to contribute to elucidating critical phenomena in early life and developing new bio-inspired applications.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東京科学大学リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Science Tokyo Research Repository Website (T2R2).