

光遺伝子操作法を用いた分子コンピューティング

藤本健造（北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科）

1. 研究の目的

遂行的処理を行う現存の計算機が苦手とする NP 問題を DNA の並列処理能力に着目し演算に利用する DNA コンピュータの可能性が示されて以来、様々な研究者が DNA コンピューティングに取り組んできた。そして、その殆どが酵素的に DNA を操作する系であったため、使用する酵素ごとに pH、温度といった規約条件が発生し、操作が複雑かつ技術を要するなど大きな欠点を抱えていた。そこで酵素を必要としない光遺伝子操作法を利用した新たな計算機構を分子コンピューティングに導入することを目的としている。具体的には、枝分かれする DNA 分子を基本とした分子メモリの開発をそれら分子メモリ及び非酵素ライゲーションの特質を活かした遺伝子解析を目標とした。

2. 研究項目

本計画研究では大きく分けて次の 2 つの研究項目を用意した。

「枝分かれする DNA 分子を基本とした非天然核酸構造を有する分子メモリの開発」

今までにないブランチ（枝分かれ）核酸やキャップ核酸やパドロック核酸を分子メモリとする新奇 DNA 構造をベースにした分子操作を目指すこととした。またその様な新奇 DNA 構造が織りなす今までにない非直線的な DNA ワールド固有の新しい物性・機能を探索しようと考えた。出来上がった構造の物性測定を行い天然の DNA にはない新しい特性を利用して今までにない DNA 操作技術への展開も一つの研究項目とした。また新奇構造だからこそ意味を持つような機能を逆に埋め込むことも考えており、「ひも状構造でないからこそできる操作、即ち DNA 構造ベースの合理的設計に基づく今までにない DNA 操作」を本課題のアウトプットとして研究推進することにした。

「非酵素的な光連結の特性を利用した遺伝子解析及び分子コンピューティング」

酵素を使わない DNA の可逆的な光連結反応を用いることで、その特性を活かした(1) 新規 SNP タイピング法への応用及び DNA コンピューティングへの適用を行なうこととした。SNP 診断は、配列中の一塩基の情報を識別する技術である。一方、DNA コンピューティングは DNA 配列にエンコードされた情報を読み取り処理するものであり、SNP 診断をはじめ多くの遺伝子操作技術と技術的にオーバーラップする面が多く互換性があると考え研究推進することとした。

3. 活動報告

平成17年度

全体会合にて2回報告及び発表を行なった。

「光連結核酸塩基ライブラリーの紹介及び使用法解説」2005年5月24日

「光遺伝子操作法を用いた分子コンピューティング」2005年10月25日

公開シンポジウム(2006年3月)にてポスター発表を行なった。

光応答性分子ライブラリーをメンバーに紹介すると共に、その使用法等に関する解説を行なった。

平成18年度

核酸化学シンポジウムにて成果発表を行なった。特定領域全体会合に参加し、他研究班との交流を行ない、光クロスリンクする光応答性分子を含むオリゴ核酸を依頼されたグループに提供した。特に萩谷班陶山グループとの連携により光ライゲーションを利用した耐熱性DNAナノ構造体の構築に成功した。またBIO-EXPO 2006に出展し、光連結に関する技術の紹介を行なった。

4. 研究成果概要

得られた研究成果を年度毎にまとめると次の通りである。

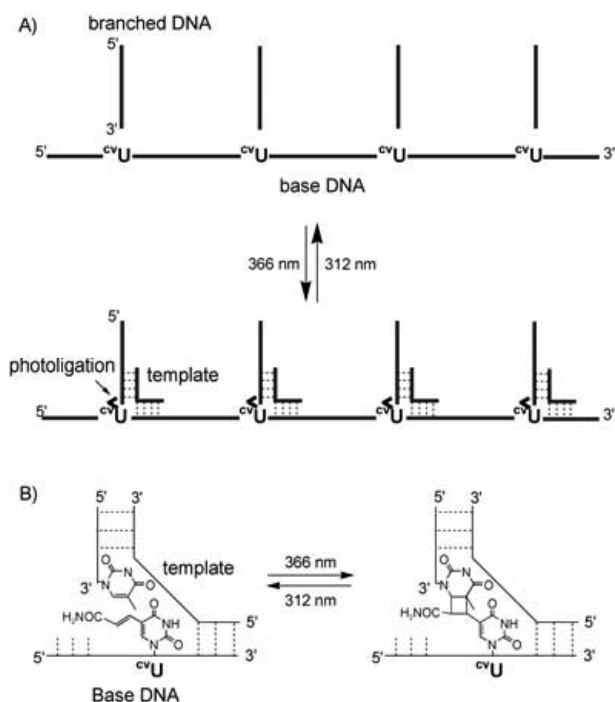
平成17年度

「枝分かれするDNA分子を基本とした分子メモリの開発」

研究計画通り、枝分かれするDNA分子の開発を行なった。光応答性核酸塩基としてカルボキシビニルウラシルを含むDNAを用いることで枝分かれ構造を容易に作り出せることを見出した(論文1、右図参照)。この手法を用いることで可逆的に多分岐構造も容易に調整できることを見出した。今までのDNA枝分かれ構造はHolidayジャンクション部位を模倣した会合状態により作り出されたものでありこの様に共有結合により形成される枝分かれ構造は興味深い

この開発された分岐構造を有するDNA構築を参考に5'末端に含む人工DNAをガラスビーズ上に固定させた系を用いることで酵素を使わずに簡単な2-SAT問題が解けることを実証した(論文2)。また鋳型DNA上での直列連結に関する光応答性人工塩基ラ

ライブラリーのさらなる拡張を目指しカルボキシビニルデアザプリンの合成に成功した (論文 5、6)。さらに DNA 末端を光で閉じる光応答型 DNA キャッピングを N3-メチルシアノビニルウラシルを用いることで可能にした (論文 4)。末端を閉じることで熱的安定性が著しく増し、DNA 分解酵素に対しても耐性を獲得するなど、ユニークな物性を有しており DNA ナノ構造構築の基礎となる技術と考えられる。その他、カルバモイルビニルフェノールを用いることで鋳型 DNA に対し光クロスリンクすることを見いだした (論文 3)。以上、様々な反応特性を有する光応答型人工塩基がさらにライブラリーに加わった (論文 7、8、9)。



- 1) Shinzi Ogasawara and Kenzo Fujimoto " A Novel Method to Synthesize Versatile Multiple-Branched DNA (MB-DNA) by Reversible Photochemical Ligation " *ChemBioChem* **2005**, 10(6), 1756-1760
- 2) Shinzi Ogasawara and Kenzo Fujimoto " Solution of a SAT Problem on a Photochemical DNA Computer " *Chem. Lett.* **2005**, 34(3), 378-381
- 3) Yoshinaga Yoshimura, Yoshiaki Ito and Kenzo Fujimoto " Interstrand Photocrosslinking of DNA via *p*-Carbamoylvinyl Phenol Nucleoside " *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2005**, 15(5), 1299-1302
- 4) Kenzo Fujimoto, Yoshinaga Yoshimura, Tadayoshi Ikemoto, Akio Nakazawa, Masayuki Hayashi and Isao Saito "Photoinduced DNA end capping via N3-methyl-5-cyanovinyl-2-deoxyuridine" *Chemical Communication* **2005** 24, 3177-3179
- 5) Isao Saito, Yohei Miyauchi, Yoshio Saito and Kenzo Fujimoto " Template Directed Photoreversible ligation of DNA via carboxyvinyl-deazaadenosine " *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 97-99
- 6) Masayuki Ogino, Shinzi Ogasawara, Takehiro Ami and Kenzo Fujimoto "Photochemical ODN Manipulation Based on Reversible DNA Photoligation Mediated by Modified

Photoresponsive Base" *Journal of Photopolymer Science and Technology* **2005** 15(5),
1299-1304

- 7) Masayuki Ogino, Yoshinaga Yoshimura, Akio Nakazawa, Isao Saito and Kenzo Fujimoto
"Template-directed DNA photoligation via a -5-cyanovinyldeoxyuridine" *Org. Lett.* **2005** 14,
2853-2858
- 8) Shinzi Ogasawara and Kenzo Fujimoto "Photo-triggered ODN manipulation on DNA chip"
Nucleic Acid Symp. Series. **2005** 49, 141-142
- 9) Yoshinaga Yoshimura, Yuuki Noguchi, Hideaki Sato and Kenzo Fujimoto "RNA
template-directed photoligation via 5-carboxyvinyl-2'-deoxyuridine" *Nucleic Acid Symp.
Series.* **2005** 49, 143-144

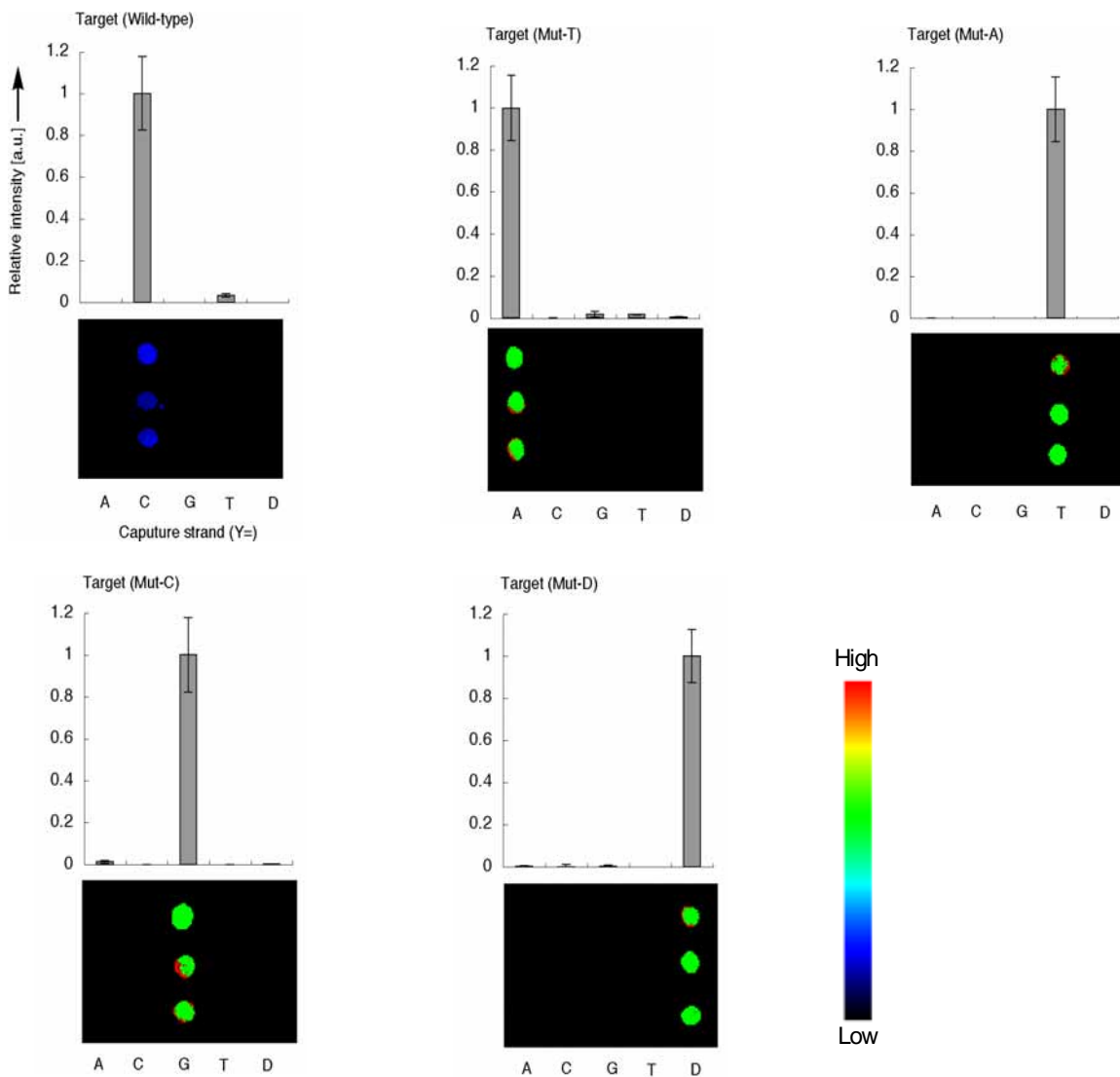
平成 18 年度

「光連結法を用いた分子操作 高感度遺伝子解析への適用」

DNA チップによる遺伝子検出はハイスループットであり、有望な SNP (一塩基多型) 検出技術の一つである。しかし、既存の DNA チップの検出原理はターゲットとプローブの特異的なハイブリダイゼーションによるものであり、この原理では SNP のようにターゲット配列中の僅かな変異を識別させることは困難である。現法では、ハイブリダイゼーション・洗浄過程で厳重な温度管理をすることで対処しているが、たとえ適切な温度制御を行ったとしても、洗浄時におけるマッチターゲットの流出・ミスマッチターゲットの残留が起こり、これが解析ミスに直結し、信頼性を低下させている。これに対し、DNA の光連結反応を導入した新規の検出系を考案した。ハイブリダイゼーション特異性によるターゲット認識に加え、光応答性キャプチャー (366 nm 照射により標識された DNA とクロスリンクする) の光連結反応特異性を付加させることで SNP 識別能を向上させようと考えた。実際の SNP 診断を模したモデル系を用い本法の SNP 識別能の変異導入部位依存性を検証した結果、変異が光連結反応点から数塩基 (~5 塩基) 以内に導入された時、高い識別能を示した。反応点に近い位置に変異を導入した方が光応答性塩基 (cvU) のスタッキングを

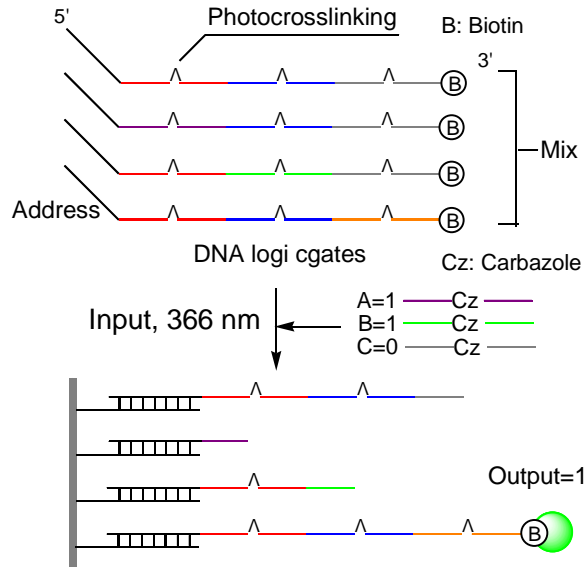
QuickTimey C2
TIFFAia êKÇ»ÇuAji êLiEVeçEOÉaEÁ
Ç™Ç+ÇÀÈsENE EEEÇ%a@ÇEÇZÇ%Ç...ÇÖiKovÇ-Ç AB

より乱すためだと考えられる。光連結反応において、cvU のスタッキングによる安定化は極めて重要な要素であり、変異導入による DNA 二本鎖の乱れが反応点へと波及することでその効果を減少させ、不安定にさせる。結果として光連結反応は起こらず変異を識別できる。次に p53 遺伝子のホットスポットを含む長鎖ターゲットを用い、本法の検出に要する時間、識別能を検証した。その結果、キャプチャー配列に対しマッチである変異型遺伝子の反応効率はおよそ 10 分で 50%に達したのに対し、ミスマッチである野生型では 2 時間後も反応効率はほぼ 0%であり、僅か数分の反応時間で高い識別能を示した。また、変異部位に 5 パターンの塩基 (A, G, C, T, Deletion) を導入し同様の実験を行なったところ、どの塩基に対しても現法のおよそ 100 倍である 10^3 -fold という高い識別能を示した (下図)。



「光連結法を組み込んだ分子コンピューティングの実践」

遂行的処理を行う既存のコンピューターが苦手とする NP 完全問題の解法に対し、並列処理能力に優れた DNA コンピューターの可能性が示されて以来、様々 DNA コンピューティング法が開発されてきた。しかし、その原理の多くはハイブリダイゼーション特異性のみを用いた処理であったため、SNP 診断と同様処理過程でのエラーといった問題が残った。そこで、エラーを抑制できる可逆的光連結反応を用いた DNA コンピューティング法を開発を行なった。ハイブリダイゼーション・熱変性で行なっていた



いた解候補 DNA のキャッチ&リリースを光照射による連結・切断に置き換えた系を設計し SAT(充足可能性)問題を解いた。結果、処理過程でのエラーがなく非常に S/N 比の高いコンピューティングに成功した。本法は、DNA の分枝型連結を使うことで実現可能な系であり、酵素による代行はできず、可逆的光連結反応でのみ構築が可能である。また、ハイスループットコンピューティングを可能にする分枝型 DNA の新規合成法を開発した。次に、コンピューターの基本であるロジックゲートを DNA で構築することを試みた。ロジックゲートは 3 つの基本要素(NOT、AND、OR)から成り、全ての回路がこれら 3 要素から構築可能である。可逆的光連結反応を用いた DNA ロジックゲートを設計するにあたり、配列特異的に切断できる新しい光反応を開発した。増感剤であるカルバゾールを相補配列(インプット配列)に導入することで、還元的に光連結部位を配列特異的に切断することが可能になり、これまでのように溶液中の光連結産物(ゲート)を無差別に切断するのではなく、目的のゲートのみを切断できるため、ゲートの並列処理が可能となった。初めに 3 つの基本ゲートを構築し、カルバゾールが導入された DNA を入力した結果、真理値表と完全に一致した出力が観測された。これら基本ゲートの設計法を用いることであらゆる回路が構築できる。その一例として、二進数の足し算を処理するユニットである full-adder を同設計法を用い構築した。真理値表と完全に一致し、“1”、“0”の差が非常に明確な結果が得られた。

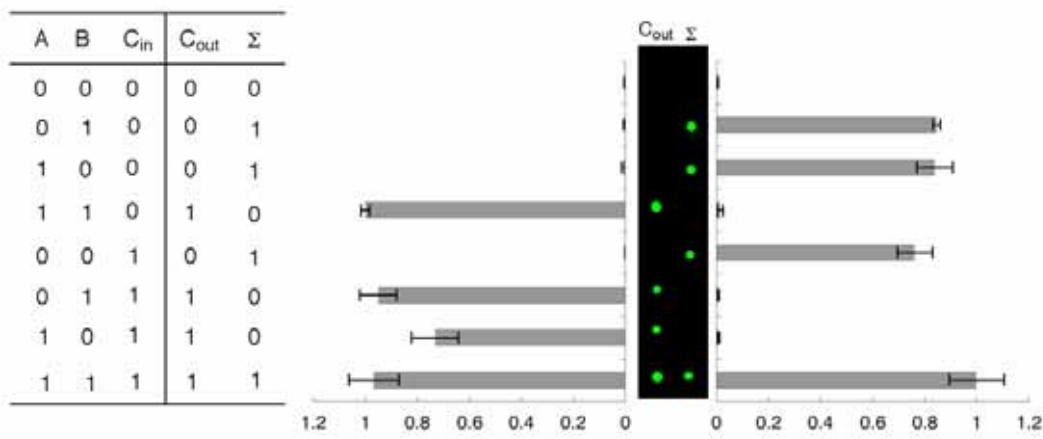
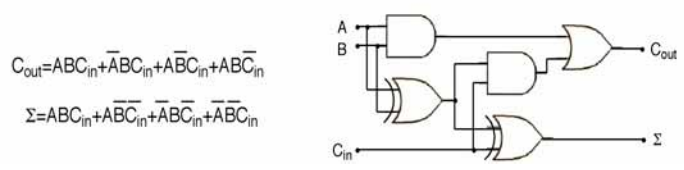
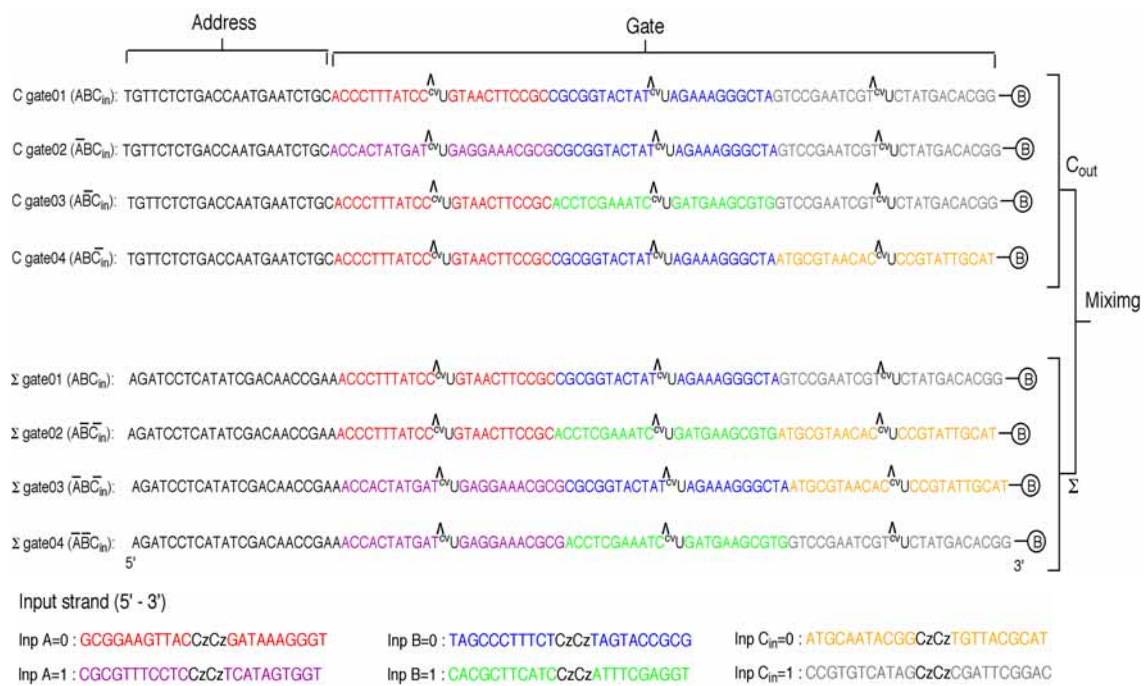


図. 光ライゲーションを用いた論理計算

「光ライゲーションを利用した耐熱性DNAナノ構造体の構築」

分子コンピューティングの応用研究のひとつとして、DNA タイルを用いた、プログラム可能な DNA ナノ構造体の自己組織化に関する研究がある。この研究は近年急速に進展し、ナノスケールの精度で、マイクロスケールの二次元構造体を形成できるようになった。形成された DNA 構造体は、様々なナノ粒子や他の分子をナノスケールの精度でボトムアップ的に配置するための鋳型として利用できる可能性がある。そのため、プログラム可能な DNA タイルの自己組織化は、次世代のナノテクノロジーの手法として大変期待されている。

二次元 DNA 構造体を集積回路のような複雑な構造物を作るための鋳型として利用するには、部品を階層的に組み立てる必要があるため、DNA 構造体には熱安定性が求められる。そのような DNA 構造体を作るには、自己組織化により結合した DNA タイル同士をライゲーションにより再び外れないようにする方法が考えられる。しかし、複雑な構造体のニック部分には酵素が十分にアクセスできないため、DNA リガーゼによるライゲーションが困難である問題があった。

本研究では、酵素を必要としない光ライゲーション法を用いて DNA 構造体のライゲーションを行い、耐熱性のある DNA 構造体を作ることに成功した。

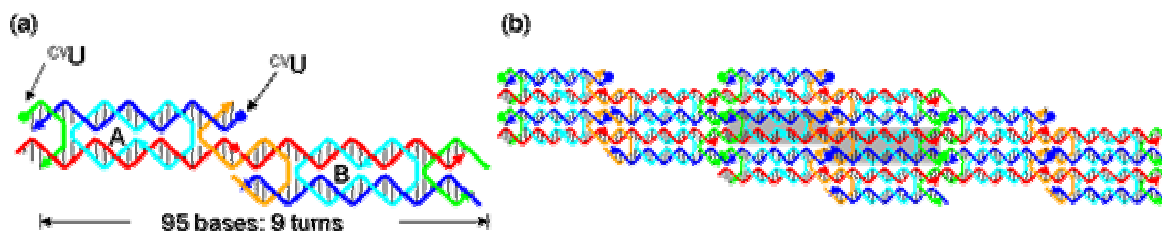


図 1 . (a) DXAB タイル (b) DXAB タイルの自己組織化による二次元構造体形成

DNA タイルとして、新しく考案した DXAB タイル (図 1) を用いた。このタイルを用いることにより、光ライゲーション後も平面構造を保つことができた。DXAB タイルの粘着末端の 2 か所にカルボキシビニルウラシ (^{CVU}) を導入し、構造体形成後、360nm の UV 光を照射することで、タイル間のライゲーションを行った。

光ライゲーション前後の構造体の融解曲線を測定した結果、ライゲーション後のサン

プルの方がより熱に強いことがわかった。また、AFMによりナノスケールの実際の構造を画像化し（図2）、40-75の熱処理後のサンプルの構造変化を比較した。その結果、ライゲーショ前のサンプルは40で完全に壊れたのに対し、ライゲーショ後のサンプルは45でも壊れておらず、二次元構造体の秩序的なアレイが確認できた。マイカ基板の上に吸着した後で熱処理した場合は、光ライゲーショ前のサンプルは45で壊れ始めたのに対し、光ライゲーショ後の構造体は65まで壊れず、20も熱安定性が増した。

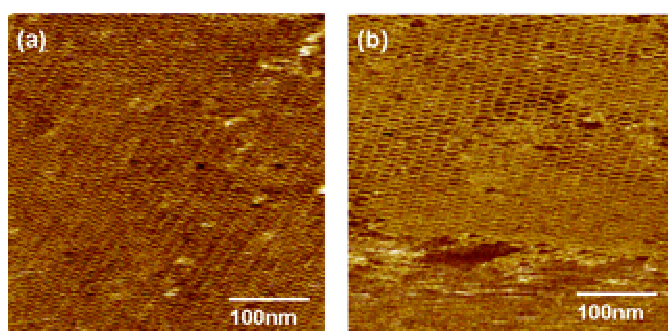


図2 . 光ライゲーショ前 (a) 後 (b) の DNA 構造体

また、ルーラー分子 (mDNA) を用いたプログラマブルな DNA 構造体の自己組織化 (図3) を行った結果、アドレス情報を持った設計どおりの構造体を作ることができた。今後は、副生成物ができないような濃度・温度条件を見つけ、よりエラーの少ないプログラマブルな DNA 構造体を作る予定である。

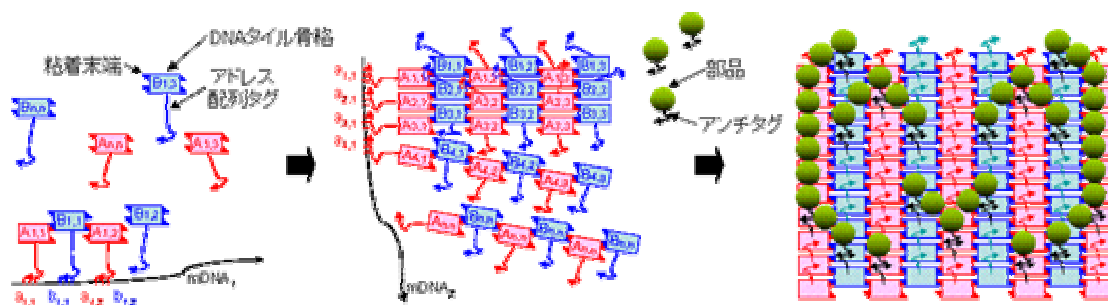


図3 . ルーラー分子を用いたプログラマブルな DNA 構造体の形成

- 10) Masayuki Ogino and Kenzo Fujimoto "Photochemical Synthesis of R-Shaped DNA toward in vitro DNA Recombination and Processing" *Angewandte Chemie Int. Ed.* 2006, 45, 7223-7225
- 11) Yoshinaga Yoshimura, Daisuke Okamura, Masayuki Ogino and Kenzo Fujimoto "Highly selective and sensitive template-directed photoligation of DNA via 5-carbamoylvinyl-2-deoxyuridine" *Org. Lett.* 2006, 8(22), 5049-5052
- 12) Shinzi Ogasawara and Kenzo Fujimoto "SNP Genotyping using Photochemical Ligation" *Angewandte Chemie Int. Ed.* 2006, 45, 4512-4515
- 13) Kenzo Fujimoto, Shigeo Matsuda, Yoshinaga Yoshimura, Takashi Matsumura, Masayuki Hayashi and Isao Saito "Site-specific Transition of Cytosine to Uracil via Reversible DNA Photoligation" *Chemical Communications* 2006, 30, 3223-3225
- 14) Yoshinaga Yoshimura, Yuuki Noguchi and Kenzo Fujimoto "Template-directed DNA photoligation in rapid and selective detection of RNA point mutations" *ChemBioChem* 2006, 7(4), 598-601
- 15) Yoshinaga Yoshimura and Kenzo Fujimoto "Catalytic Repair of a Thymine Dimer in DNA via Carbazole Nucleoside" *Chem. Lett.* 2006, 35(4), 386-389
- 16) Takehiro Ami and Kenzo Fujimoto "Fluorescence labeling of DNA based on photochemical ligation" *Science Technology of Advanced Materials* 2006, 7, 249-253
- 17) Masayuki Ogino, Daisuke Okamura, Yoshinaga Yoshimura and Kenzo Fujimoto "Nucleotide insertion opposite a cyclobutane pyrimidine dimer analogue caused from photoligation by a replicative DNA polymerase" *Nucleic Acids Symp. Series* 2006, 50, 125-126
- 18) Yoshinaga Yoshimura and Kenzo Fujimoto "Photoinduced repair of a thymine dimer in DNA via carbazole nucleoside" *Nucleic Acids Symp. Series* 2006, 50, 151-152
- 19) Shinzi Ogasawara and Kenzo Fujimoto "High selectivity detection of point mutation by DNA photochemical cross-linking" *Nucleic Acids Symp. Series* 2006, 50, 173-174
- 20) Miho Tagawa, Koh-ichiroh Shohda, Kenzo Fujimoto, and Akira Suyama "Heat-resistant DNA arrays constructed by self-assembly." *Proc. of NanoBio-Tokyo 2006*, 2006, 383-384 .

5. 今後の課題

現在、主流となっている自律的なコンピューティングにどの程度貢献できるかが課題であると考えている。光を用いた手法の利点は「狙った場所に狙ったタイミングで必要な量だけ処理できる」点であるが、逆に自律的なコンピューティングには今のところ不向きである。また今後、より生体内で行なわれている複雑系が織りなす生命現象のモデル化等を行なっていくのであれば、生体内での分子操作という観点からも長い波長で操作できる分子が望まれる。また枝分かれ核酸構造や R 型核酸構造といった非天然型の核酸構造を調整する技術の確立に成功しているが、それらをどう分子コンピューティングに活かすのかも今後の課題であると考えている。

6. 研究費の使用状況

平成17年度

主な設備品として、必要な蛍光ラベルされた核酸を用いた光連結効率の定量的評価を行なう為に488nm アルゴンレーザーモジュールを購入した。国内旅費・DNA合成機関連の試薬、光応答性人工分子合成の為に試薬・溶媒等の消耗品を購入した。

平成18年度

主な設備品として、DNAチップ上での分子計算結果の呼び出しの為に卓上型分注ロボットを購入した。国内旅費・DNA合成機関連の試薬、光応答性人工分子合成の為に試薬・溶媒等の消耗品を購入した。