

# 形態変化する分子を用いた並行計算と分散計算

萩谷昌己(東京大学・大学院情報理工学系研究科)

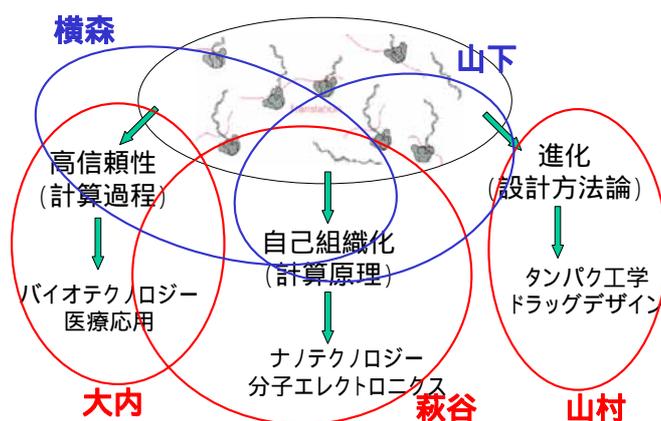
## 1. 目標

本研究班は、以下の図にあるように本研究領域の中心に位置し、分子コンピューティング技術をナノテクノロジーとバイオテクノロジー(特に遺伝子計測)へ応用することを念頭において、分子と分子反応の設計論を確立することを目指している。

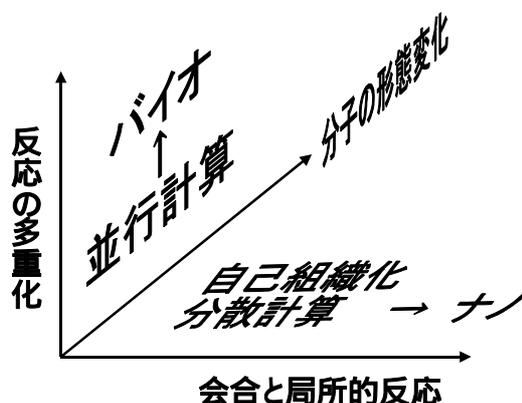
本研究班は、理論班(横森班と山下班)の研究成果を実証実験と通して評価するとともに、理論班の研究成果を基礎として、分子と分子反応の設計論の構築を進める。構築した設計論に基づいて分子システムを実装し、実証実験を通して設計論の評価を行う。設計論の構築と分子システムの実装は、常にナノテクノロジーとバイオテクノロジーへの応用の可能性を念頭において進める。また、分子反応の信頼性を向上させるために大内班が得た知見を活用するとともに、バイオテクノロジーへの応用に関しても大内班と協力して検討を進める。

本研究班の特徴は、ほとんどのメンバーが、理論モデルの構築とその解析だけではなく、実証実験も行っていることである。このために、実証実験に裏打ちされた設計論の構築を進めることができる。さらに、応用分野のメンバーを中心に、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーへの実用的な応用の可能性を活発に模索している。

## 設計論のための3つの切り口



本研究班では、分子と分子反応の設計論を確立するために、以下の図のように、分子の形態変化、会合と局所的反応、反応の多重化の三つの軸に沿って研究を進める。



分子の設計に関しては、特に形態変化する分子をその中心におく。形態変化によって複数の状態間の遷移が可能な分子は、分子マシンや分子素子の基礎となるだろう。これと、分子反応の設計に関する二つの軸(会合と局所的反応および反応の多重化)を以下のように組み合わせる。

会合は複数の分子が複合体を形成することである。局所的反応とは分子の複合体において近傍の分子とのみ可能な反応のことであり、分子間の通信を実現し、分子による分散計算の基礎になると考えられる。会合と局所的反応によって、プログラムされた分子の自己組織化によるパターン形成、パターンの固体表面への固定、固体表面上でのパターン形成などが可能となる。分子の形態変化と会合や局所的反応を組み合わせることにより、さらに複雑な分散計算、そして、パターン形成が可能になるだろう。

反応の多重化とは、並行に進む複数の反応をシステムティックに組み合わせることを意味している。分子の形態変化は多重化すべき反応の一つとして自然に含まれ、多様な形態変化が並列に実行されることになる。生化学反応の自動制御ロボットやマイクロ生化学システムにおける反応が多重化された反応の典型例であり、このような反応の設計論を確立することが本研究の目標である。特に、ハイブリッド型 DNA コンピュータとシリコン樹脂を用いたマイクロ生化学システム、および、これらの DNA コンピュータにおける反応を効率よく制御するためのプログラミング言語とコンパイラの開発を行い、遺伝子発現解析や SNP 解析への応用を目指す。

## 2. 研究項目と役割分担

本節では、以上の三つの方向性、すなわち、「分子の形態変化 分子マシン」の方向、「分子の自己組織化 微小パターンの形成」の方向、「DNA コンピュータ バイオテクノロジーへの応用」の方向

に分けて、本研究班の研究項目と役割分担について説明する。

本研究班は、萩谷を中心に、以下のメンバーにより研究を進めている。

萩谷昌己・John A. Rose(東京大学・大学院情報理工学系研究科)  
横山茂之(東京大学・大学院理学系研究科) --- 平成 16 年度より  
陶山明(東京大学・大学院総合文化研究科)  
藤井輝夫・山本貴富喜(東京大学・生産技術研究所)  
浅沼浩之(東京大学・先端科学技術研究センター)  
村田智(東京工業大学・大学院総合理工学研究科)  
岩崎裕・吉信達夫(大阪大学・産業科学研究所)  
西川明男(大阪電気通信大学) --- 平成 14 年度と平成 15 年度

このうち、萩谷と Rose はコンピュータ科学が専門であるが、小さいながらも DNA 関連の最小限の実験設備を有している。横山は生物化学が専門であり、理化学研究所の主任研究員も兼任しており、巨大な実験設備を有している。萩谷に実験に関する助言も行っている。陶山は生物物理が専門であり、DNA 関連の様々な実験を行うため多くの実験設備を有している。萩谷に実験に関する助言も行っている。藤井と山本はマイクロ生化学システムを独自に開発している。浅沼は有機化学が専門であり、有機合成の設備を含む多くの実験設備を有している。萩谷に対して合成した DNA の提供も行っている。岩崎と吉信は応用物理が専門であり、AFM 装置をはじめとして、表面加工のための多くの実験設備を有している。陶山や村田が作成した DNA 構造を AFM を用いて観察することも行っている。(西川は岩崎と吉信と協力して実験を行った。) 村田は機械工学が専門であるが、DNA 関連の実験室を立ち上げる計画を持っている。

## 2.1. 分子の形態変化 分子マシン

### 形態変化する DNA 分子の設計方法

萩谷は、形態変化する DNA 分子の設計方法に関する研究を行う。特に、一つの二次構造から別の二次構造へ形態を変化させる DNA 配列の設計方法の開発を目指す。より具体的には、入力に依存して異なる二次構造へ変化する DNA 配列の設計方法の開発を行う。特に、温度や光によって形態を変化させる分子機械の設計方法について検討する。具体的には、浅沼が開発している光機能性超分子を配列の設計方法に取り込むことを試みる。

### 分子マシンの光制御を目指した光機能性超分子の構築

浅沼は、DNA 分子に挿入され形態変化を惹き起こす光機能性超分子の研究を進める。特に、アゾベンゼンの trans-cis 異性化に伴う二重鎖の形成と解離の光制御機構を物理化学的な分析とコンピュ

ーターモデリングにより明らかにし、より高効率な光応答性DNAを設計・合成する。更に、これを用いて核酸から成る分子マシンの光制御を行い、最終的に光駆動型分子マシンの構築を目指す。そのための基盤技術の一つとして、分子マシンの精密設計のために必要な、熱力学的パラメータを算出する。

## 2.2. 分子の自己組織化 微小パターンの形成

### 分子の自己組織的集合モデル

村田は、複数の内部状態をもち、互いに通信が可能な分子を仮定して、それらが自己組織的に一定の形態(フォーメーション)を形成する方法について研究する。具体的には、分子の結合状態に応じて結合の距離や頻度を制御することにより、マクロな構造を生成するアルゴリズムを、計算機シミュレーションと機械モデル分子実験の両面から検討する。さらに、仮想バネモデルによる分子の自己組織的集合モデルを発展させ、実際のDNA分子の物理化学的性質を考慮したより精密なモデルを構築することによって、DNA分子集合体の形状(輪郭)および格子パターンを制御する方法論の確立を目指す。具体的には、複層化 DNA タイルの配列設計を行うとともに、結合の配列依存性などを考慮することにより、自己集合シミュレーションを精密化し、エラー率などの性能を推定する。また、単純化した実験系により、エラー率制御の可能性を検証する。

### 原子間力顕微鏡を用いた生体分子微細パターン作製法の開発

岩崎、吉信、西川は、DNA、タンパク質などを中心に生体分子のシリコンの固体表面への固定法を調査し、分子計算を活用した固体表面における微細構造形成のために最もふさわしい固定方法を開発する。また、固定が行われたかどうかを確認するための観察手法についても並行して研究を行う。さらに、シリコンの表面に加えて、他の物質表面への技術の転用の可能性も検討する。これらの研究を通して、DNA の塩基配列設計を含む分子計算技術に基づく微細構造形成の基礎技術の構築を目指す。

## 2.3. DNA コンピュータ バイオテクノロジーへの応用

### ハイブリッド型 DNA コンピュータによる遺伝子解析

陶山は、電子コンピュータによって反応が自動制御されるハイブリッド型 DNA コンピュータのための信頼性の高い DNA 符号を開発し、それらを用いて遺伝子の発現解析が行えることを示す。ハイブリッド型 DNA コンピュータによる計算は、内部コードに変換された入力データに、DNA 分子反応で実装された計算規則を適用することにより行われる。計算の信頼性は内部コードである DNA 符号の特性に大きく依存する。そこで、信頼性の高い DNA 符号を構築するために必要となる正規直交配列の開発を行う。熱力学的安定性に関する尺度を基にして正規直交配列を設計し、その特性を実験により評価する。次に、開発された DNA 符号を用いたハイブリッド型 DNA コンピュータを遺伝子発現解析に応用する。電子コンピュータとは異なり、DNA コンピュータは分子で与えられた入力データをそのまま計算処理で

きるため、バイオテクノロジーへの新しい応用が可能である。遺伝子発現解析に必要なとされる計算規則を実装した DNA 分子反応の特性を実験により明らかにし、その結果に基づいて信頼性の高い遺伝子発現解析が行えることを示す。

### **タグとアンチタグのシステムの忠実度**

Rose は、ハイブリッド型 DNA コンピュータに関連して、TAT システム (タグとアンチタグのシステム) のエラーを見積もるために、一般的な条件のもとで平衡論的な解析を行う。この解析は、ハイブリッド型 DNA コンピュータの DNA 符号の評価に直接的に用いることができるとともに、ハイブリダイゼーションに基づく反応設計の基礎となる。

### **マイクロチップのための微量液体制御機構の開発**

藤井と山本は、微小流路構造を持つマイクロ流体デバイスにて分子計算実装技術の開発に取り組む。微小流路内において微小液滴 (容量: 数 nL) 操作を可能とするデバイスを作製し DNA ハイブリダイゼーション反応を行う。微量な液滴で反応操作を行うことにより、酵素の総反応時間すなわち、分子による計算時間を短縮することが期待できる。続いて、微小流路内に電極を作りこみ、微小液滴をサンプルプラグとして電気泳動を行うための集積化デバイスの設計に取り組む。また、マイクロ流体デバイスの分子計算実装の具体的な応用として、PNA (Peptide Nucleic Acid) と DNA を用いた分子メモリ書き込み・読み出し用デバイスを製作し、書き込み (DNA-PNA 反応) から、読み出し (電気泳動) までの一連の操作の自動化を実現する。さらに、微量液体操作の自動化を進めるとともに、数 bit の分子メモリの書き込み・読み出し操作が可能となるデバイスの開発にあたる。

### **DNA コンピュータのためのコンパイラ**

萩谷は、これらの DNA コンピュータにおける反応を効率的に制御するための方法について研究を進める。具体的には、ハイブリッド型 DNA コンピュータのためのプログラミング言語とコンパイラの開発を行う。特に、整数線形計画法を応用して最適な命令スケジューリングとリソース割り当てを実現する方法を確立する。また、集積化デバイスの反応を効率的に制御する方法についても検討を進める。

## **3. 活動状況と班内の連携状況**

個々の研究項目は、特定のメンバーが主体的に行っているが、萩谷を中心に、様々な形で班内の連携を行っている。具体的には、これまでに以下のような連携を行った。

- ・ 萩谷は、形態変化する DNA 分子として、浅沼の開発している光応答性 DNA も対象に研究を進めている。最終的には、光によって形態を変化させる分子マシンの実装を目標としている。浅沼の合成した光応答性 DNA を用いて形態変化の実証実験も行っている。
- ・ 萩谷と Rose が実験を行うに際して、陶山と横山より多くの助言を得た。
- ・ 村田は、DNA タイルの設計のために、萩谷と協力して、DNA のハイブリダイゼーションに関する検討を行った。

- ・ 萩谷は、陶山の協力ののもとに、ハイブリッド型 DNA コンピュータのコンパイラの開発を行っている。
- ・ Rose は、萩谷および陶山の協力ののもとに、タグとアンチタグのシステムの平衡論的解析を進めている。
- ・ 岩崎と吉信は、陶山や村田が作成した DNA 構造を AFM を用いて観察した。

以上に加えて、萩谷が領域代表であるため、定例の研究会、公開シンポジウム、夏季セミナーなど、領域全体の催しには多くのメンバーが参加し、研究交流を進めている。特に、以下のように研究発表を行った。

- ・ 平成 15 年 3 月 15 日(土)の全体会議  
村田
- ・ 平成 15 年の夏季セミナー後の萩谷班会合(2003 年 8 月 7 日)  
浅沼・金田(藤井代理)・西川
- ・ 平成 16 年 3 月 20 日(土)の全体会議  
浅沼および金田(藤井代理)
- ・ 平成 16 年の夏季セミナー  
萩谷・陶山・浅沼・金田(藤井代理)

## 4. 研究成果

本節では、各研究項目について、これまでの研究成果をまとめる。

### 形態変化する DNA 分子の設計方法

萩谷昌己(東京大学・大学院情報理工学系研究科)

#### 【平成 14 年度】

形態によって状態を表現し、形態変化によって状態遷移を実現する多状態 DNA ナノマシンの実現を目指して、DNA の連続したヘアピン構造が逐次的に構造変化を起こすことによって多状態をとる分子機械のための二次構造設計に関する研究を進めた。このような大規模な分子機械を複数の DNA 分子で構成する場合には既存の方法では不十分である。そこで本研究の二次構造設計では、DNA 二次構造をヘアピン構造単位で分割することにより、構造変化動作の網羅的な検証を可能にしている。また最小自由エネルギーだけでなく、DNA の構造変化経路や sub-optimal な構造を含んだ出現頻度も考慮している。そのため、より熱力学的に適した配列の設計が可能である。以上の二次構造設計を C 言語でプログラム実装した。また光による分子機械の制御を目指して、浅沼のアゾ化合物を付加した DNA の熱力学的モデルを提案し、そのモデルを実装した。

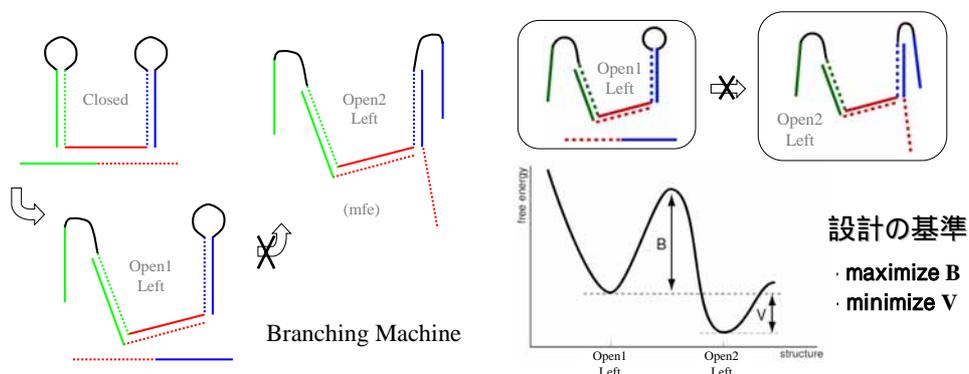
Masami Hagiya, John A. Rose, Ken Komiya, and Kensaku Sakamoto: Complexity analysis of the SAT engine: DNA algorithms as probabilistic algorithms, *Theoretical Computer Science*, Vol.287, 2002, pp.59-71.

Hiroki Uejima, Masami Hagiya and Satoshi Kobayashi: Horn Clause Computation by Self-Assembly of DNA Molecules, *DNA Computing, 7th International Meeting on DNA-Based Computers, DNA7, Tampa, FL, USA, June 2001, Revised Papers*, Lecture Notes in Computer Science, Vol.2340, Springer, 2002, pp.308-320.

Masami Hagiya and Azuma Ohichi: *DNA Computing, 8th International Meeting on DNA-Based Computers, DNA8, Sapporo, Japan, June 2002, Revised Papers*, Lecture Notes in Computer Science, Vol.2568, Springer, 2003.

### 【平成 15 年度】

本年度は、昨年度に引き続き DNA のヘアピン構造の開裂を利用した状態機械の設計と実現を行った。以下は、オープナーによって左右の二つのヘアピンのうち的一方が開く分子機械である。オープナーには左右のヘアピンに対応した二種類がある。一方のオープナーが左か右のヘアピンを開くと、もう一方のオープナーを与えてもハイブリダイズできない。すなわち、初期状態からオープナーによって二つの状態のどちらかに分岐する機械となっている。



実は、両方のオープナーを入れた場合、両方のヘアピンが開いた形態が最もエネルギーが低い状態 (mfe すなわち minimum free energy の状態) になる。しかし、この状態に到達するにはエネルギーの障壁を乗り越えなければならないので、通常は片方のヘアピンが開いた状態に留まるわけである。従って、この分子機械をロバストに動作させるためには、エネルギーの障壁がなるべく高くなるような分子設計 (配列設計) を行わなければならない。そこで我々は、分子の形態のエネルギー地形、特に、ある形態から別の形態に変化する際の形態変化経路を解析することにより、エネルギー障壁を求めたり、そのエネルギー障壁が高くなるような配列を探索したりする技術の開発を行っている。

2 つの二次構造間にあるエネルギー障壁の高さは構造変化経路に依存する値だが、それは一意に

は決まらない。そこで本研究では、下記のような 3 種類に特徴的な構造変化経路を定義し、その定義に基づいた経路予測のアルゴリズムを解析し、実装した。

- 局所最適最短経路:最短経路のうち局所的なエネルギー増加が最小に保たれた経路。
- 大域最適最短経路:最短経路のうちエネルギーのピークが最も低い経路。
- 大域最適経路:あらゆる経路のうちエネルギーのピークが最も低い経路。

昨年度は、大域最適最短経路をヒューリスティクスによって近似的に求める効率のよいアルゴリズムの開発を行った。今年度は、大域最適経路を求めるアルゴリズムを考案し実装した(下左図)。

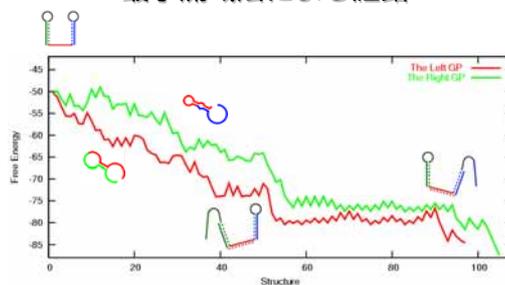
#### Minimum Basin Algorithm(最小流域アルゴリズム)

- 2点を含む最小の流域を求めるグラフ探索法。
- 始点から終点までのエネルギー地形(集合B)を、低い点を選択しながら探索・生成。(最小の流域)
- Prim-Dijkstra法の一つ。

1. 始点・終点は与えられている。
2. 集合B、集合Nは空集合。(Basin,Neighbor)
3. 始点を集合Bに加える。
4. 集合Bに隣接する点を集合Nに加える。
5. 集合Nの最も低いエネルギーの要素を集合Bに加える。(複数ある時は全てBに加える)
6. Step4に戻る。Step5で、加える点が終点であったら終了。

出力は集合B。その最大の要素が障壁になる。  
集合Bの解析が形態変化経路予測として有効。

#### 最小流域法による経路



障壁だけでなく経路についての議論ができる。

このアルゴリズムを用いることにより、実際の DNA 配列に対する実験結果をある程度説明することができた(上右図)。

Mitsuhiro Kubota, Kazumasa Ohtake, Ken Komiya, Kensaku Sakamoto and Masami Hagiya: Branching DNA Machines Based on Transitions of Hairpin Structures, *Proceedings of the 2003 Congress on Evolutionary Computation (CEC'03)*, 2003, pp.2542-2548.

Hiroki Uejima and Masami Hagiya: Secondary Structure Design of Multi-state DNA Machines Based on Sequential Structure Transitions, *DNA9, Ninth International Meeting on DNA Based Computers, Preliminary Proceedings*, 2003, pp.80-91.

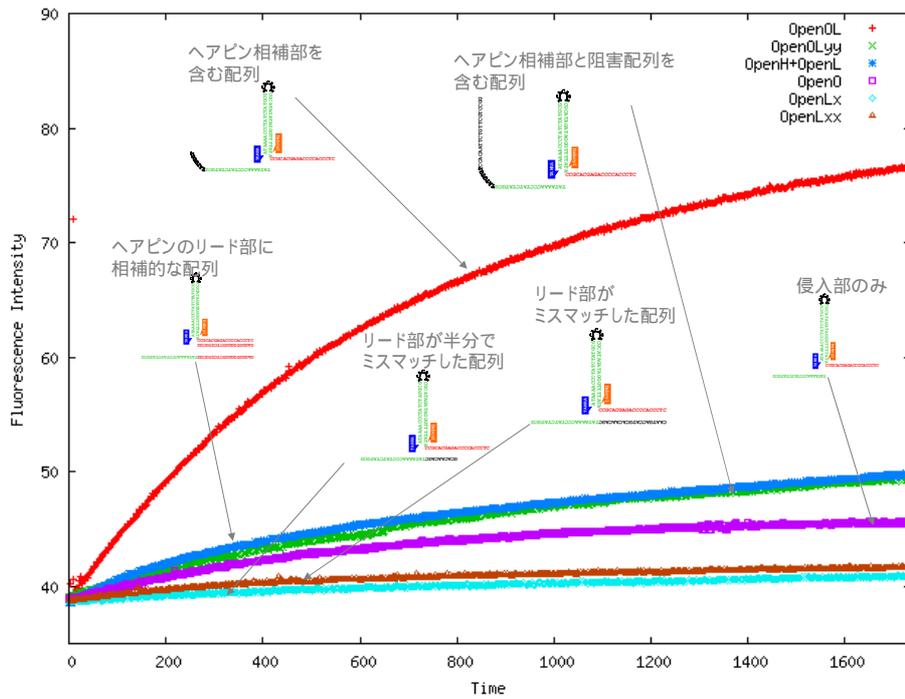
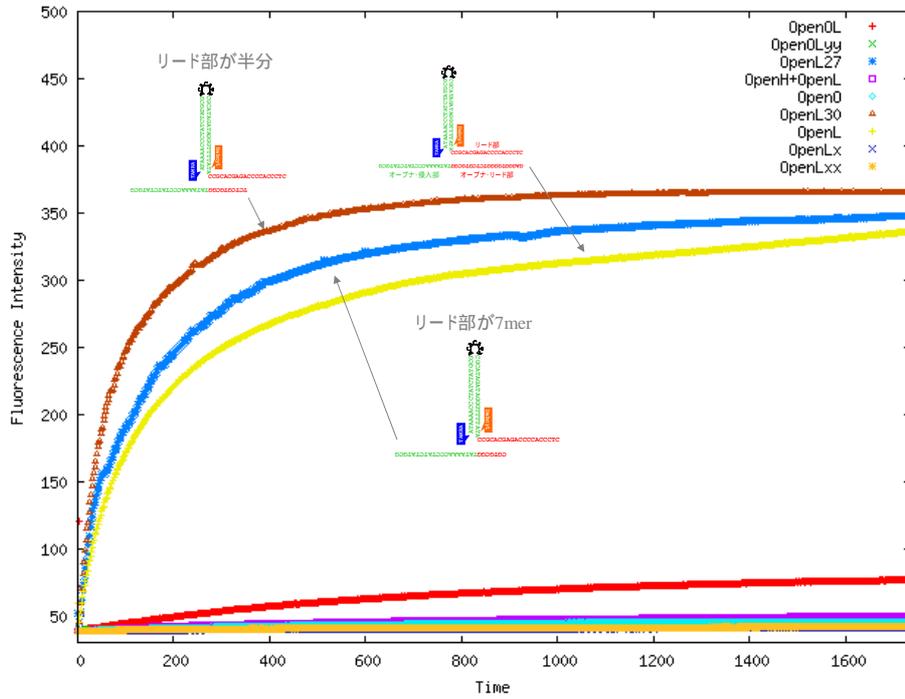
Hiroki Uejima and Masami Hagiya: Analyzing Secondary Structure Transition Paths of DNA/RNA Molecules, 同上, pp.92-96.

Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto, Hiroki Uejima, Masami Hagiya, Kensaku Sakamoto and Azuma Ohuchi, Conformational Addressing using the hairpin structure of single-strand DNA, 同上, pp.197-201.

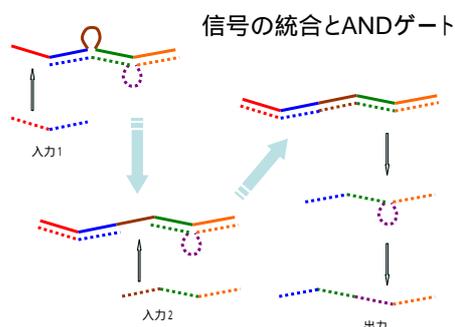
#### 【平成 16 年度】

本年度は、まず、蛍光分子と消光分子が挿入されたヘアピン DNA を用いて、ヘアピン開裂の基礎実験を行い、これまでの設計論の正当性を確認するとともに、今後の分子マシンの設計に向けた知見を得た。

以下は実験結果の一部である。ヘアピンの開裂が、正しいオープナによってのみ可能であること、ヘアピン開裂を阻害する配列の有効性、オープナのリード部分の特異性などを確認することができた。



以上の知見も加えて、ヘアピン開裂およびバルジ開裂を活用した、より汎用的な分子マシンの設計論を確立することを目標として研究を進めた。特に、独立した分子マシンだけでなく、一つの分子マシンの構造変化が他の分子マシンの構造変化を段階的に引き起こす、分子マシンのネットワークの設計論を最終的な目標とした。このようなネットワークの例として、論理ゲートとセンサからなる汎用的な分子システムを構想した。また、より複雑な例として、分子マシンのネットワークによって任意の状態数を持つ有限オートマトンを構成するアイデアを提案した。以下は、AND ゲートを実現する分子マシンの例である。



この方向の研究は、ヘアピンとバルジによる並行計算として来年度以降も進めて行く。

以上のような分子マシンを実装するためには、長さの異なる DNA 配列を組み合わせる必要がある。DNA 配列セットの設計方法として、有田と小林によるテンプレート法がよく用いられているが、これは等長の DNA 配列からなる配列セットを生成するものである。本年度は、異なる長さのテンプレートを組み合わせることで、異なる長さの DNA 配列からなる配列セットを生成できるように、テンプレート法の拡張を行った。

また、形態変化する DNA 分子を設計するための基礎技術として、DNA と RNA の二次構造予測の技術がある。与えられた配列の DNA もしくは RNA に対して、自由エネルギーが最小の二次構造を求める。また、与えられた配列が取り得る二次構造を網羅することにより分配関数を計算する。どちらも、動的計画法に基づくアルゴリズムである。これらのアルゴリズムを複数の塩基配列に適用する場合には、複数の配列を仮想的な塩基で繋いで一つの配列としてアルゴリズムを適用するのであるが、この際に、仮想塩基を含むループ構造を適切に扱う必要がある。本研究でこれまでに用いていたアルゴリズムにはいくつかの細かい問題があった。本年度は、これらのアルゴリズムを詳細に検討し直し、複数の塩基配列を正しく処理できるような改良を行った。具体的には、最小自由エネルギーおよび分配関数を計算する動的計画法のアルゴリズムを改良し、仮想塩基を含むマルチループを正しく処理できるようにした。実際に、改良されたアルゴリズムを Vienna Package に対する拡張として実装した。

Masami Hagiya: Towards Molecular Programming - a Personal Report on DNA8 and Molecular Computing, Modelling in Molecular Biology (G. Ciobanu, G. Rozenberg, Eds.), Natural Computing Series, Springer, 2004, pp.125-140.

Mitsuhiro Kubota and Masami Hagiya: Minimum Basin Algorithm: An Effective Analysis Technique for DNA Energy Landscapes, *DNA10, Tenth International Meeting on DNA Based Computers*, Preliminary Proceedings, 2004, pp.202-213.

Masami Hagiya: DNA Nanorobotics and Sequence Design, Proc. SICE Annual Conference, Sapporo, 2004, pp.2774-2778.

Keiichiro Takahashi and Masami Hagiya: On Computation of Minimum Free Energy and Partition Function of Multiple Nucleic Acid Sequences, *FIT2004, Forum on Information Science and Technology*, 2004, Vol.1, pp.91-92.

Keiichiro Takahashi and Masami Hagiya: Preliminary Experiments on Hairpin Structure Dissociation for Constructing Robust DNA Machines, *Proceedings of the 2004 IEEE Conference on Cybernetics and Intelligent Systems*, Singapore, 1-3 December, 2004, pp.285-290.

## 分子マシンの光制御を目指した光機能性超分子の構築

浅沼浩之（東京大学・先端科学技術研究センター）

### 【平成 14 年度】

DNA の二重鎖あるいは三重鎖の形成と解離が、特定波長の光照射のみで自在に制御できれば、分子マシンの光制御が期待できる。我々は DNA のダイナミックな形態変化を引き起こすことを目的とし、本年度は光照射により構造異性化する有機分子 = アゾベンゼンを DNA に化学的に導入した化学修飾 DNA を合成した。アゾベンゼンは、D-threoninol をリンカーとして使用して対応するアミダイトモナーを化学合成し、DNA 合成機によって鎖中に導入した。アゾベンゼンをアミダイトモナー化することで、これを DNA 鎖中の任意の位置に導入することが可能となった。得られた化学修飾 DNA は、アゾベンゼンが *trans* 体の場合には DNA 二重鎖が安定化するが、UV 光照射で *cis* 体に異性化すると大きく不安定化し二重鎖が解離することを見出した（図 1 参照）。アゾベンゼンの *trans-cis* 異性化は完全に可逆的であり、可視光照射により *cis*-アゾベンゼンは再び *trans*-体に異性化し、それに伴って DNA 二重鎖が再び形成された。以上のように、アゾベンゼンを DNA 鎖中に導入することで、二重鎖（あるいは三重鎖）の形成と解離の光制御が可能なることを見出した。

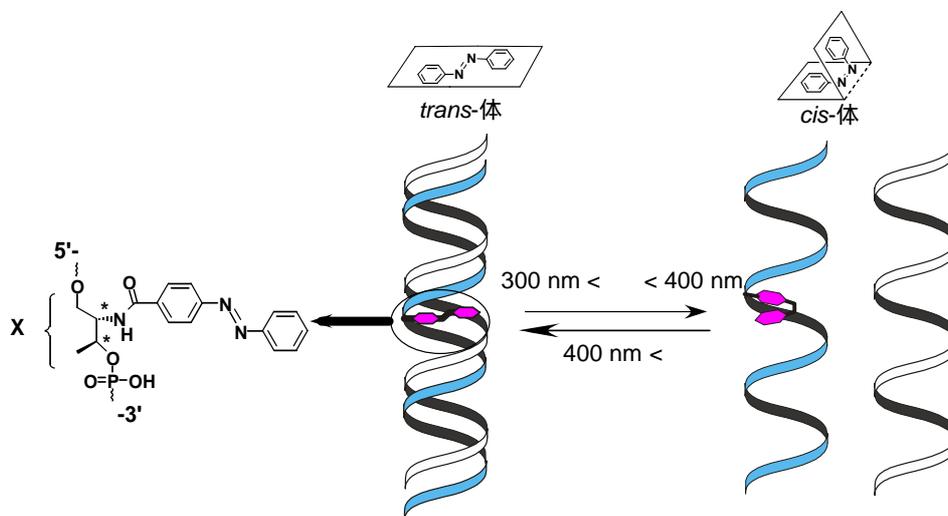


図1 アゾベンゼン導入 DNA による二重鎖の形成と解離の光制御

リンカーに D-threoninol (X の主鎖部分) を使用することで、高効率な光制御を実現

- (1) X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, "Photo-Regulation of DNA-Triplex Formation by Azobenzene" *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 1877-1883.
- (2) H. Asanuma, D. Tamaru, A. Yamazawa, M. Liu, M. Komiyama, "Photo-Regulation of Transcription Reaction by T7 RNA Polymerase by Tethering an Azobenzene in the Promoter" *CHEMBIOCHEM.* **2002**, 786-789.
- (3) H. Asanuma, M. Liu, D. Tamaru, X. Liang, M. Komiyama, "Photo-regulation of transcription by RNA polymerase with azobenzene-tethered promoter", *Nucleic Acids Res. Supple. 2*, **2002**, 75-76.
- (4) H. Asanuma, K. Shirasuka, M. Komiyama, "H-Aggregation of Methyl Reds by the Hybridization of DNA-Dye conjugates", *Chem. Lett.*, **2002**, 490-491.
- (5) H. Asanuma, T. Takarada, K. Shirasuka, M. Komiyama, "DNA-Dye conjugates for controllable H\* aggregation" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2217.
- (6) 浅沼浩之 "DNA の光機能化" *高分子*, **2003**, 52(3), 139.

**【平成15年度】**

我々は DNA のダイナミックな形態変化を引き起こすことを目的とし、前年度は光照射により構造異性化する有機分子 = アゾベンゼンを DNA に化学的に導入した化学修飾 DNA を合成した。本年度は、実際の分子マシンの光制御を可能にするため、二重鎖の形成と解離を On-Off 的に制御できる高効率な光応答性 DNA オリゴマー設計を行った。

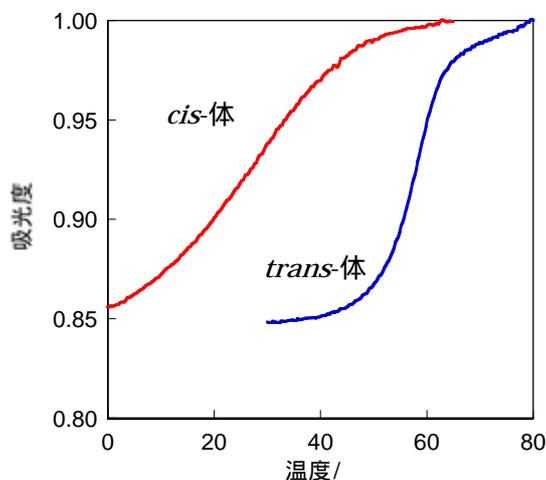


図2 アゾベンゼンの光異性化に伴う二重鎖の高効率光制御

光応答性 DNA:

5'-CTX TTX AAX GAX AGX GAX GAX TAX TAX CC-3'

X: 図1 参照

相補鎖:

3'-GAA ATT CTT CCT CTA TAT GG-5'

アンチセンス DNA など実際に用いられている DNA の鎖長は 20mer 前後であり, この程度の DNA のハイブリダイゼーションを光制御できれば, 実際の系への適用が可能になる. そこで 20mer の DNA を高効率に光制御することを目標に, 最適なアゾベンゼン残基導入数を調べた. 導入するアゾベンゼン残基の数を 1 から 10 まで系統的に変化させたところ, アゾベンゼンが *trans*-体の場合には  $T_m$  は残基の導入数に依存せずほぼ一定であったが, *cis* 体では導入数の増加に伴い単調に低下した. *trans-cis* 異性化に伴う  $T_m$  の変化 ( $T_m$ ) は, 天然の塩基 2 つに対してアゾベンゼンを 1 個の割合で等間隔に 9 個導入した場合に最大となった. この場合ハイブリダイゼーションの制御能は 37 で最大 80% 以上に達し, 実質的に二重鎖の形成と解離の on-off 制御を実現できた (図 2 参照).

(1) H. Asanuma, D. Matsunaga, M. Liu, X. Liang, J. Zhao, M. Komiyama, "Photo-regulation of DNA function by azobenzene-tethered oligonucleotides", *Nucleic Acids Res. Supple.* 3, **2003**, 117-118.

(2) M. Liu, H. Asanuma, M. Komiyama, "Effective photo-regulation of transcription reaction by SP6 RNA polymerase with modified DNA tethering multiple azobenzenes", *Nucleic Acids Res. Supple.* 3, **2003**, 265-266.

(3) X. Liang, H. Asanuma, H. Kashida, A. Takasu, T. Sakamoto, G. Kawai, M. Komiyama, "NMR study on the Photo-responsive DNA Tethering an Azobenzene. Assignment of the Absolute Configuration of Two Diastereomers and Structure Determination of their Duplexes in the *trans*-Form.", *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 16408-16415.

(4) M. Liu, D. Tamaru, H. Asanuma, M. Komiyama, "Synergistic Effect of the Two Azobenzenes in the Promoter on the Photo-Regulation of Transcription Reaction with SP6 RNA Polymerase", *Chem.*

*Lett.* **2003**, *32*(12), 1174-1175.

(5) H. Asanuma, H. Kashida, M. Komiyama, "DNA-Naphthyl Red conjugate as a visualizing probe of DNA hybridization", *Chem. Commun.*, **2003**, 1536-1537.

(6) H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, "Development of a probe DNA which accompanies color change by hybridization", *Nucleic Acids Res. Supple.* **3**, **2003**, 143-144.

(7) 浅沼浩之: "遺伝子発現の人工的制御", *バイオマテリアル-生体材料*, **2003**, *21*(4), 289-296.

(8) 浅沼浩之, 櫻田啓: "光機能性 DNA の設計と応用", *高分子加工*, **2004**, *53*(1), 37-43.

### 【平成16年度】

我々は前年度において, アゾベンゼン残基の導入数を天然の塩基数の半分程度導入することで, 二重鎖の形成と解離を実質的に On-Off 光制御することに成功した. 本年度はこの成果を踏まえ, アゾベンゼン導入 DNA を用いた光駆動型分子マシンへの応用を目指した. そこで光駆動型分子マシンの酵素反応への応用も視野に入れた, DNA の RNA への光転送を実現した. その戦略を以下に記す (図3 参照). まず光応答性 DNA (= センス鎖: RNA と全く同じ配列を持つ DNA 鎖) と, その相補的 DNA (= アンチセンス鎖), および RNA を共存させる. アゾベンゼンが *trans* 体の場合はセンス鎖の DNA とアンチセンス鎖の DNA が強固に二重鎖を形成するので, アンチセンス DNA は RNA とハイブリダイズしない. しかし UV 光を照射し *cis*-体に異性化させるとアンチセンス DNA が光応答性 DNA から遊離し, これが RNA とハイブリダイズことで光転送が実現する. モデル系を組んで実際に行ったところ, 非常に効率よくアンチセンス DNA が光転送されることが判明した. また, この光転送系を応用することで, 遺伝子発現に深く関与している酵素である RNase H の光制御も実現した.

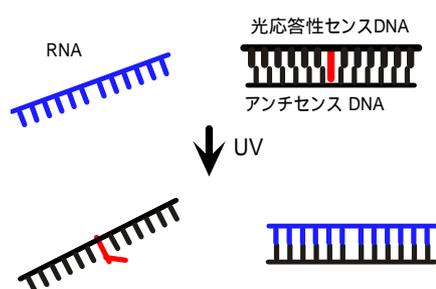


図3 光応答性 DNA をセンス鎖に用いたアンチセンス鎖の RNA への光転送

アゾベンゼンが *trans* 体の場合はアンチセンス鎖と強くハイブリダイズしているが, UV 照射で *cis* 体に異性化するとアンチセンス鎖が放出され, RNA とハイブリダイズする.

1) D. Matsunaga, H. Asanuma, M. Komiyama, "Photo-regulation of RNA Digestion by RNase H with Azobenzene-Tethered DNA", *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11452-11453.

2) J. Zhao, J. Zhou, M. Liu, H. Asanuma, M. Komiyama, "Photoregulation of in vitro transcription/translation of GFP by tethering an azobenzene to T7 promoter." *Nucleic Acids Res. Supple.* **4**, **2004**, 199-200

3) M. Liu, H. Asanuma, M. Komiyama, "Real time monitoring of the interaction of T7 RNA polymerase

with azobenzene-tethered T7 promoter by affinity biosensor”, *Nucleic Acids Res. Supple.* 4, **2004**, 221-222.

4) H. Asanuma, H. Kashida, M. Komiyama, “Interstrand H aggregation of cationic dyes for narrowing the absorption spectra and stabilizing the duplex”, *Supramol. Chem.* **2004**, 16, 459-464.

5) H. Asanuma, D. Matsunaga, M. Komiyama, Azobenzene-tethered DNA towards the photo-regulation of molecular machine, *DNA10, Tenth International Meeting on DNA Based Computers*, Preliminary Proceedings, **2004**, p.434.

6) H. Asanuma, H. Kashida, M. Komiyama, “Alternating hetero H-aggregation of different dyes by interstrand stacking from two DNA-dye conjugates”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 6522-6525.

7) 浅沼浩之, “バイオナノデバイスとしての人工 DNA”, *化学と教育*, **2005**, 53, 12-15.

## 分子の自己組織的集合モデル

村田智 (東京工業大学・大学院総合理工学研究科)

### 【平成 14 年度】

分子の自己組織的集合による大域的構造形成の手法の確立を目指して、均質な素子が局所的な相互作用により一定の形態を形成するモデルの研究を行った。このモデルは、各素子を同じ性質を持つ質点としてあらし、一定近傍半径内の他の素子と仮想バネによって力学的に相互作用させるものである。仮想バネの性質(ばね乗数, 自然長, 存在確率)をばね両端の素子に結合しているほかの素子の数(結合数)によって変化させることにより、望みの形態を自己組織的に組み立てることができることを2次元シミュレーションによって確認した。今後は、DNAタイリングなど、より実際の分子に近い形式のモデル構築およびより複雑な形状の組み立てについて検討する。

藤林健一, 村田智, 菅原研, 山村雅幸: 仮想バネモデルによる自己組織的フォーメーション形成, 第8回創発システム・シンポジウム資料, 95/96 (2002).

K.Fujibayashi, S.Murata, K.Sugawara, M.Yamamura: Self-Organizing Formation Algorithm for Active Elements, Proc. 21<sup>st</sup> IEEE Symposium on Reliable Distributed Systems, 416/421 (2002).

### 【平成 15 年度】

DNA コンピューティングの分野において、Winfree は「DNA タイル」を用いた DNA 分子の会合による計算法を提案した。DNA タイルとは 4 カ所に粘着末端と呼ばれる一本鎖 DNA をもつ平面構造の分子である。この粘着末端の会合(ハイブリダイゼーション)により二次元的な反応が進む集合体を形成することができる(図 1)。DNA タイルの自己集合(self-assembly)は、計算として利用できるほか、ナノ構造を形成するという面でも注目されている。しかし、実際に形成される集合体は、成長時に多くのエラーが発生してしまうので実用化には至っていない。

そこで、Winfree は自己集合の熱力学的なモデルを提案し、自己集合プロセスの解析をおこなった。

このモデルのシミュレーションにより、温度や DNA タイルの濃度などの物理的な条件を制御することで、エラーの少ない望みの集合体を成長させることができることを示したが、エラーを少なく制御しようとするほど、集合体が正しく成長するのに多くの時間がかかってしまうという問題があった。これを改善したのが Winfree による Proofreading Tile Model (PTM) である。このモデルはタイルを分割することでエラー率と成長速度を改善させることに成功している。しかしタイルを分割すると、それに必要な粘着末端の数が増加し配列設計が難しくなってしまう。

本研究では、Winfree が提案した従来のモデルを拡張した Layered Tile Model (LTM) を提案する。このモデルは、集合体を形成するタイル(original tile)と、そのタイルの粘着末端を保護するためのタイル(protective tile)を重ねることで、タイルの状態変化を可能とする構造としたものである(図 2a)。protective tile を重ねたタイルが集合体に正しく結合した場合に限り、protective tile のみ外れるように粘着末端を設計することで、エラー率を大幅に下げることができる(図 2b)。このモデルのシミュレーションおよび理論解析を行った結果、エラー率・成長速度において、LTM は PTM の 10 倍の性能をもつだけでなく、タイルの濃度や温度の変化に強いことがわかった。また、protective tile の導入により、集合体同士のランダムな凝集を抑制する働きがあることもわかった。ゆえに、これらの特長から、高効率なモデルが実装可能であると期待される。

今後は、本モデルを実装するために、複層化タイルの配列設計および合成を検討する。さらに実験による評価も行う必要がある。

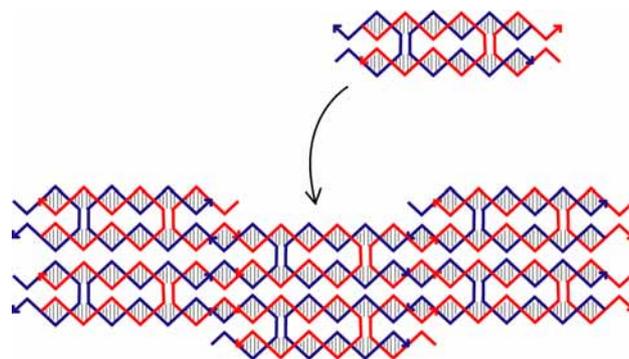


図 1: DNA タイルの自己集合。粘着末端により、タイル同士を結合することができる。

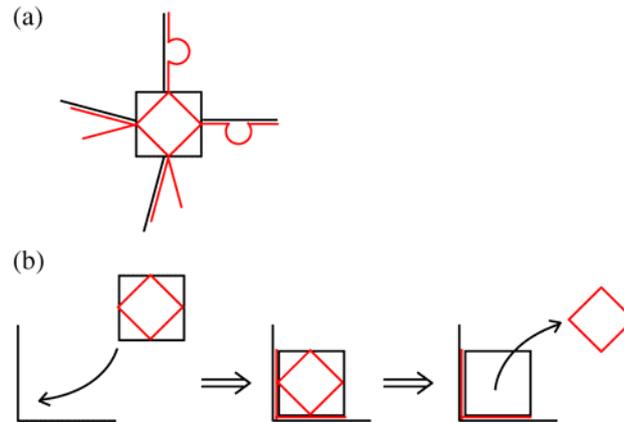
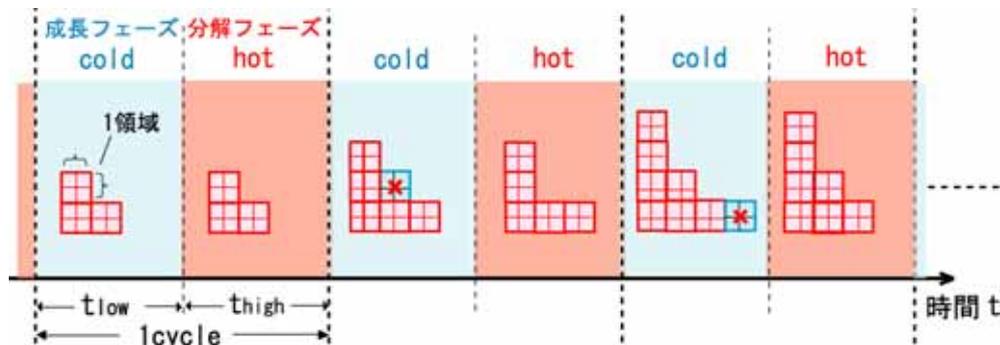


図2: (a) DNA タイルによる, original tile (黒色)と protective tile(赤色)を二層に重ねたときの構造. 各辺の粘着末端はそれぞれ異なる構造をもつ. (b) タイルの結合プロセス. 集合体に対して複層化されたタイルの2辺がマッチしたときのみ上層の protective tile が外れ, 次のタイルの結合を許可する.

#### 【平成16年度】

上記のモデルのシミュレーション及び解析結果等についてミラノ(イタリア)で開催されたDNA10で発表したところ, DNA タイルの創始者である E. Winfree(カリフォルニア工科大学)からコンタクトがあった. 先方では, より単純なしくみによるエラー率抑制モデルのアイデア(未発表)をもっており, その性能の見積もりについて研究協力を要請された. そこでこれについて簡単な解析をおこなったところ, カリフォルニア工科大学のモデルにはエラー率抑制効果がほとんどないことが予想されるが, その一方で, タイル全体の輪郭制御についての手がかりが含まれていることがわかった. また, 複層化によるエラー抑制のより詳細なシミュレーションおよび DNA 分子による実装にむけて, カリフォルニア工科大学と共同で研究することになり, Winfree 研究室に博士課程の学生 1 名を派遣した.

これとは別の新たなエラー抑制手法として, 温度変化サイクルを利用する Thermal Ratchet Model を考案した. このモデルは, タイルを自己集合させる計算を行う低温の成長フェーズと, その結果エラーのある領域だけを分解する高温の分解フェーズをもつ温度変化サイクル下でタイルを自己集合させ, 成長フェーズにおいて正しく計算が行われた領域は耐熱性が高くなり, 分解フェーズで分解されないようなタイルセットを設計した. この温度サイクルの繰り返しによって, エラー率の低減が可能であることをシミュレーションで確かめた. 現在, このモデルの定量的な評価に向けて, シミュレーションの精密化と理論検討をおこなっている.



Thermal Ratchet Model の原理

1. K. Fujibayashi, S. Murata, A Method of Error Suppression for Self-Assembling DNA Tiles, Proc. 10th International Meeting on DNA Computing (DNA10), pp. 284-293, Milano (2004).
2. S. Murata, Self-Assembling DNA Tiles -Mechanisms of Error Suppression, Proc. SICE Annual Conference, pp.2764-2767 Sapporo (2004).
3. 小川賢一, 藤林健一, 村田 智, Thermal Ratchet を用いた DNA タイルのエラーフリーアセンブリ, 第 17 回自律分散システムシンポジウム資料 pp.147-152 (2005)

### 原子間力顕微鏡を用いた生体分子微細パターン作製法の開発

岩崎裕・吉信達夫（大阪大学・産業科学研究所）・西川明男（大阪電気通信大学）

#### 【平成14年度】

大阪大学産業科学研究所の岩崎を中心とするグループは、平成14年度には、分子計算の技術を活かして、生体分子の自己組織化の研究を行うための基礎となる技術を検証し、観察可能な形で生体分子を固体表面に固定する方法を開発した。

大阪大学のグループには、既にマイカやシリコン酸化膜の表面に吸着されたタンパク質などの生体分子を原子間力顕微鏡などによって観察する技術やシリコンの表面などにシリコン酸化膜の微細パターンを形成する技術があった。本年度は、微細なシリコン酸化膜形成能力を更に改良した上で、両者の技術を融合させて、生体分子の自己組織化のための良いテンプレートを作ることを目指した。具体的には、シリコン表面上に形成した微細構造を起点として、アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) およびグルタルアルデヒドをリンカーとして生体分子を選択的に固定し、それを観察する方法を研究した。その結果、サブミクロンスケールでシリコン上のパターンに選択的に分子を固定することに成功した。(図1参照)

しかしながら、現時点では、DNA固定や生体分子が固定されたパターンのナノレベルへのスケールダウンにはまだ成功していない。平成15年度には、これらの課題への取り組みを開始する。

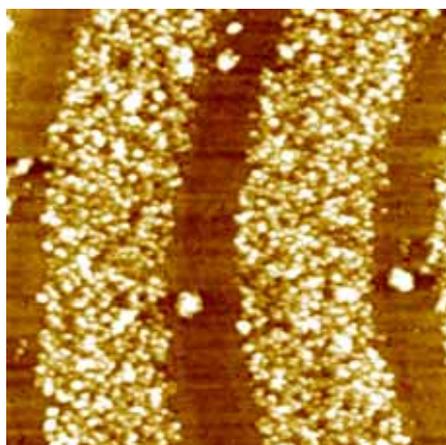


図1:シリコン上にシリコン酸化膜パターンを形成し、シリコン上のみにタンパク質が固定されていることをとらえた原子間力顕微鏡画像(2.1×2.1 μm<sup>2</sup>)

W. C. Moon, T. Yoshinobu and H. Iwasaki: "Enhanced nano-oxidation on a SC1-treated Si surface using atomic force microscopy", Jpn. J. Appl. Phys. vol.41, pp.4754-4-757, 2002.

T. Yoshinobu, J. Suzuki, W. C. Moon, H. Kurooka and H. Iwasaki: "AFM Fabrication of Oxide Patterns and Immobilization of Biomolecules on Si Surface", 53rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry 4th International Symposium on Electrochemical Micro- and Nanosystem Technologies, Dusseldorf, Germany, 15 - 20 September 2002.

A. Nishikawa, H. Kurooka, S. Antoranz Contera, W.C. Moon, T. Yoshinobu and H. Iwasaki: "Towards DNA patterning on silicon surface--consideration on basic methods--", Preliminary proceedings of Eighth International Meeting on DNA Based Computers(DNA8), p.334, Hokkaido Univ. , Sapporo, Japan, 10-13 June 2002.

西川明男:「分子計算の現状--DNA8の話題から」, Computer Today, 第19巻5号, (9月号 No.111) pp.17--21, 2002.

#### 【平成15年度】

固体表面における生体分子の微細パターン作製法として AFM 陽極酸化パターニングによる方法の開発を行った。図 1 に示すように、コンタクトモード AFM において試料表面と導電性探針の間に直流電圧を加えることによって、試料表面を陽極酸化することができる。この方法によって例えば図 2 に示すように、シリコン基板表面上に任意形状の酸化物パターンを描画することが可能である。

このようにして描画された酸化物パターンをテンプレートとして、生体分子を選択的に固定することができる。酸化物上に生体分子を固定するポジプロセスと、その逆のネガプロセスが可能である。図 3

にポジプロセスの一例を示す。あらかじめシリコン表面をオクタデシルトリクロロシラン(OTS)で保護した後, AFM 陽極酸化によって酸化物パターンを描画する。リンカー分子として  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン( $\gamma$ -APTES)とグルタルアルデヒドを用いてアルデヒド基を導入し, 最終的に酸化物パターン上にのみ生体分子を固定することができる。

図 4 はネガプロセスによってシリコン表面上の酸化物パターン以外の領域にフェリチン分子を固定した例である。フェリチンは直径約 12nm の球状たんぱく質分子である。AFM 陽極酸化を用いた場合, 数 10nm レベルの解像度で描画が可能であり, 図 5 のようにたんぱく質分子 2~3 個分の幅のアレイが作製できる。

同じ方法は DNA 分子の微細パターン作製にも適用可能である。図 6, 図 7 はそれぞれ酸化物ラインパターン, 酸化物ドットパターン上に ファージ DNA を固定した例である。後者ではドット間をワイヤリングする形で DNA 分子が固定されている。

今後, 陽極酸化の解像度を高めることによって, 究極的には 1 分子レベルの固定が可能になるものと期待され, 例えば微細電極構造上への生体分子 1 個のアラインメントといった応用が考えられる。

T. Yoshinobu, J. Suzuki, H. Kurooka, W. C. Moon and H. Iwasaki: "AFM Fabrication of Oxide Patterns and Immobilization of Biomolecules on Si Surface", *Electrochimica Acta*, 48 (2003) pp.3131-3135.

W. C. Moon, T. Yoshinobu, A. Nishikawa and H. Iwasaki: "Biomolecules Patterning on Si Surface by AFM Oxidation", *International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2003 (ISSIN-2003)*, Osaka, Japan, 8 - 9 December 2003.

W.C. Moon, A. Nishikawa, T. Yoshinobu and H. Iwasaki: "Patterned Surface as a Template for DNA-Based Nanotechnology", *proc. 2003 Congress on Evolutionary Computation (CEC 2003)*, vol.4 pp.2727--2732, Canberra, Australia, 8 - 12 December 2003.

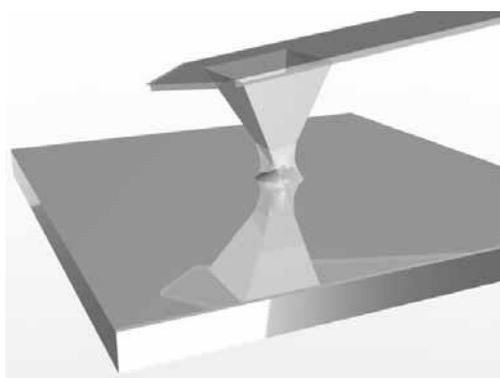


図 1 AFM 陽極酸化の模式図

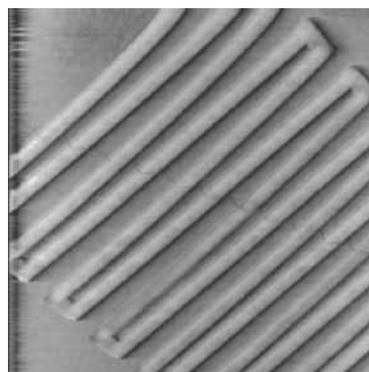


図 2 シリコン基板表面に描画した酸化物ラインパターン (AFM 像:  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ )

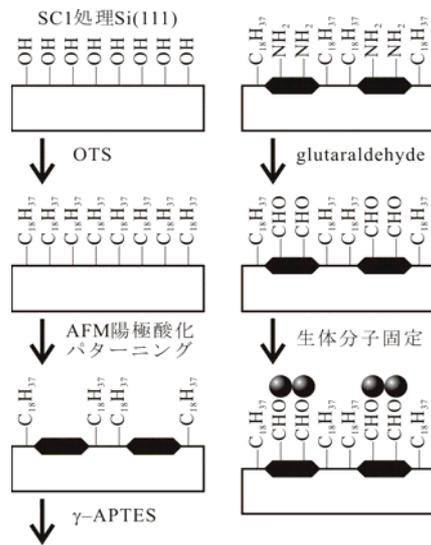


図3 ポジプロセスのフローチャート

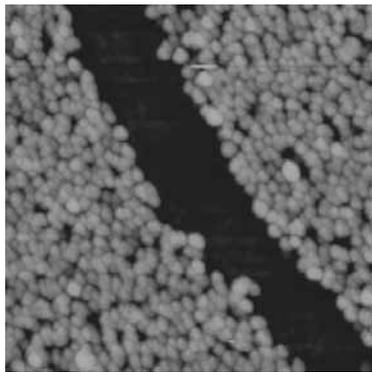


図4 フェリチン分子のネガパターン(AFM 像;  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )

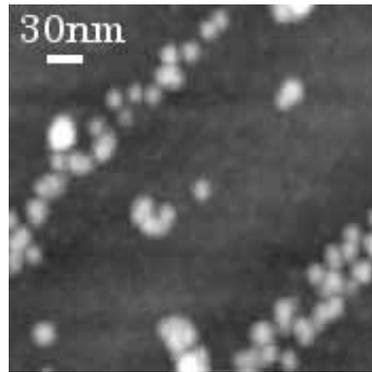


図5 フェリチン分子の一次元アレイ

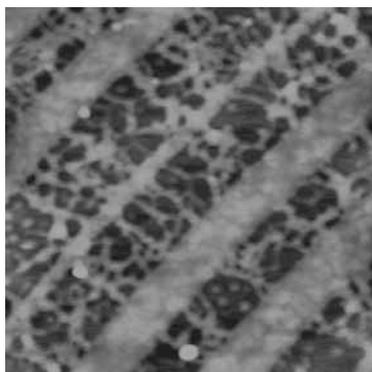


図6 酸化物ラインパターン上へのファージ DNA の固定 (AFM 像;  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$ )

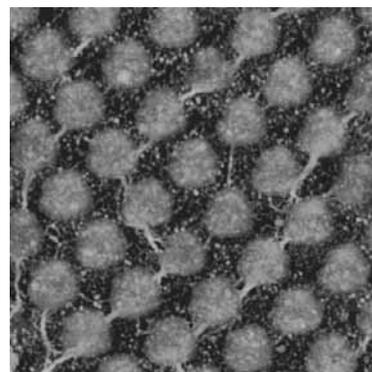


図7 酸化物ドットパターン上へのファージ DNA の固定 (AFM 像;  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ )

### 【平成 16 年度】

前年度までに、AFM 陽極酸化を用いた微細パターンニング技術を用いて、半導体シリコン表面に生体分子（たんぱく質，DNA）を固定する技術を開発した．図 1 は半導体シリコン表面に形成した酸化物ドットの 2 次元配列上に、長さ約 16 ミクロンの $\lambda$ -DNA を固定した例であり、ほぼ一直線上に DNA 分子が固定されていることがわかる．

本年度は、固定位置の精度向上を目指して実験を行った．図 2 は酸化物ドットの間隔(300nm) とほぼ同じ長さを持つ両末端アミノ修飾の DNA 分子(898bp) を酸化物ドット間に固定した例である．酸化物ドット表面はあらかじめ $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane ( $\gamma$ -APTES) および glutaraldehyde によって処理することによりアルデヒド基が導入されている．ドットおよびその間隔を小さくすることにより固定位置の分解能を向上させることができると期待される．

今後はさらに DNA の相補対形成を利用した固定位置の制御や、酸化物ドットを足場とした構造体の固定について検討を行う．

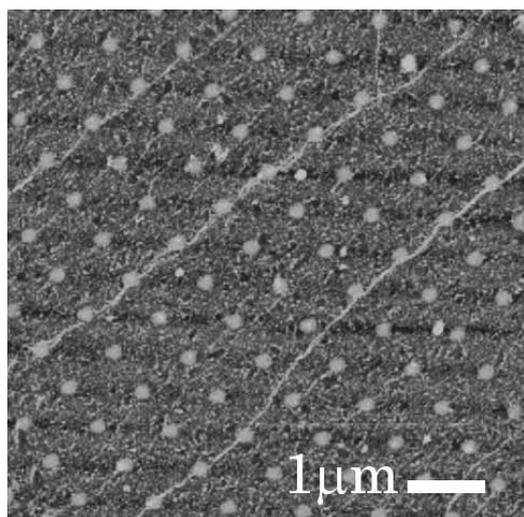


図 1 酸化物ドットアレイ上に固定された  $\lambda$ -DNA 分子

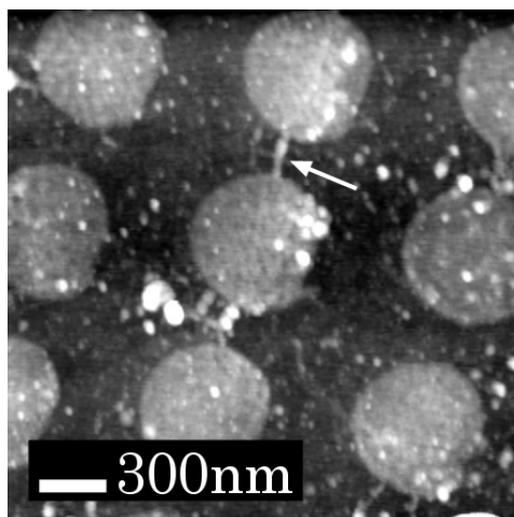


図 2 酸化物ドット間を接続する形で固定された DNA 分子

T. Yoshinobu, W.-C. Moon, A. Nishikawa, J. Suzuki and H. Iwasaki: "Application of AFM Anodic Oxidation to Patterning of Biomolecules on Si", *Sensors and Materials*, **16** (2004) pp.421-428.

W.-C. Moon, T. Yoshinobu, A. Nishikawa and H. Iwasaki: "AFM Patterning and Immobilization of Biomolecules on Si", The 10th International Meeting on Chemical Sensors (10-IMCS), Tsukuba, Japan, 11 - 14 July 2004.

T. Yoshinobu, W. Moon, A. Nishikawa, J. Suzuki and H. Iwasaki: "Micropatterning of Biomolecules on Silicon by AFM Anodic Oxidation", International Symposium on Cellular Engineering and Nanosensors (part of the 38th Annual Congress on Biomedical Engineering), Ilmenau, Germany, 21 September 2004.

T. Yoshinobu, W. Moon, A. Nishikawa and H. Iwasaki: "Immobilization of DNA on Arrayed SiO<sub>2</sub> Dots Prepared by AFM Anodic Oxidation", 5th International Symposium on Electrochemical Micro& Nanosystem Technologies (EMT2004), Tokyo, Japan, 28 September - 1 October 2004.

T. Yoshinobu, W. C. Moon, A. Nishikawa, J. Suzuki and H. Iwasaki: "Patterning of Biomolecules on Silicon by AFM Oxidation", 2004 International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2004), Osaka, Japan, 26 - 29 October, 2004.

T. Yoshinobu, W.-C. Moon, A. Nishikawa, J. Suzuki and H. Iwasaki: "AFM Micropatterning of Protein and DNA Molecules on Si", Shanghai International Conference on Physiological Biophysics (Shanghai ICPB'04), Shanghai, China, 9 - 13 November, 2004.

## ハイブリッド型 DNA コンピュータによる遺伝子解析

陶山明 (東京大学・大学院総合文化研究科)

### 【平成 14 年度】

汎用型を目指した最初の DNA コンピュータがハイブリッド型 DNA コンピュータである。その分子計算部では、データを表現するための DNA 分子の塩基配列として、正規直交配列を連結した配列が用いられる。正規直交配列は、同一の長さ、一様な融解温度と PCR 増幅効率をもち、ミスハイブリやミスプライミング、そして安定な自己二次構造を形成しないという性質をもつ塩基配列である。正確な計算反応が行えるか否かは、この正規直交配列の性能に大きく依存する。また、大規模な計算反応を行うためには、十分な数の正規直交配列が必要である。そこで、実験により性能が評価された 300 個程度の正規直交配列を開発することを目標にして研究を進めた。

正規直交配列の設計は、これまでの方法を改良することで設計効率を向上させた方法を用いて行なった。NN 法により計算された融解温度、ハミング距離、最大連続一致長を指標として、効率の良いエンジンにより発生された塩基配列から、自己の相補配列以外の相補配列および連結配列も含めて互いに正規直交する配列の集合を生成した。その後、DP による二次構造計算を行い、集合の中からさらに性能のよい配列を選択した。設計の際の条件を定めるために、DNA チップを用いてハイブリダイ

ゼーション実験を行なった結果、ハミング距離 8 以上、最大連続一致長 7 塩基以下の条件が直交性に必要であることがわかった。その条件の下で設計を行ったところ、最大で約 500 個の 23 塩基長の正規直交配列を設計することができた。この数は同じ条件でテンプレート法を用いて設計した場合の数の約 2 倍であった。

設計された正規直交配列の正規直交性を実験により評価するために、300 種類の配列について、融解温度とアニーリング効率の測定を行なった。さらに、それらの中で自己二次構造がより不安定な 120 種類の配列について、DNA チップを用いたハイブリダイゼーション実験を行なった。その結果、設計された配列が十分な正規直交性を有していることが確認された。また、120 種類の配列の中の任意の 2 つの配列を共通の配列で挟んで連結した 600 種類の 2 桁 DNA 符号化数の配列について、PCR の増幅効率を測定する実験を行った。その結果、実験誤差が多少大きいものの、誤差の範囲内で一様な増幅効率を有することがわかった。

正規直交配列を用いて正確な計算が行えるか否かを、ハイブリッド DNA コンピュータで数学的問題を解くことにより評価した。解いた問題は、DNA 計算で実際に解かれた三和積命題論理式の例題としては最も節の数の多い、10 変数 43 節の例題である。ハイブリッド DNA コンピュータの分子計算部の CPU が備えている基本命令を実行する際の効率とエラー率を最適化したのち、計算に必要な DNA の量を大幅に減らすために開発された DP のアルゴリズムを実装したプログラムをハイブリッド DNA コンピュータで走らせた。計算結果をシーケンシングにより確認したところ、109 クローン中 105 クローンが正しい解であることがわかった。誤った解をもつ 4 つのクローンでも、誤りはそれぞれ 1 箇所だけであることがわかった。この実験は、DP のアルゴリズムで具体的な例題を解く DNA 計算を実際に行った最初の例である。

A. Suyama: Programmable DNA computer with application to mathematical and biological problems.

*Preliminary Proc. of The Eighth International Meeting on DNA Based Computers*, p. 91 (2002).

N. Nishida, M. Wakui, Y. Hatta-Ohashi, T. Tokunaga, and A. Suyama: Highly specific and quantitative gene expression profiling based on DNA computing. *Preliminary Proc. of The Eighth International Meeting on DNA Based Computers*, p. 79 (2002).

N. Morimoto, M. Kiyohara, N. Sugiura, S. Karaki, T. Nakajima, T. Makino, N. Nishida, and A. Suyama: Automated processing system for gene expression profiling based on DNA computing technologies. *Preliminary Proc. of The Eighth International Meeting on DNA Based Computers*, p. 331 (2002).

T. Nakajima, Y. Sakai, and A. Suyama: Solving a 10-variable 43-clause instance of 3-SAT problems on DNA computer automatically executing a basic instruction set. *Preliminary Proc. of The Eighth International Meeting on DNA Based Computers*, p. 332 (2002).

陶山明: ハイブリッドDNAコンピュータのハードウェア. *電気学会誌*, **122** (3), 160-163 (2002).

陶山明: DNAコンピュータの現状と将来. *Computer Today No. 109*, 11-16 (2002).

陶山明: 実用化されはじめたDNAコンピューター. *日経サイエンス* 5月号, 114 (2002).

陶山明: 分子生物学の教科書に隠されていたDNAコンピューター. *細胞工学*, 21 (11), 1346-1349 (2002).

陶山明: 超並列コンピューターの誕生: エーデルマンの実験. *細胞工学* 22 (1), 75-79 (2003).

陶山明: 汎用型DNAコンピューターを目指して. *細胞工学* 22 (3), 348-352 (2003).

#### **【平成 15 年度】**

平成 15 年度は, 平成 14 年度の研究で開発された正規直交配列を使用したハイブリッド型 DNA コンピューターを用いて遺伝子発現解析のための DNA 分子反応を行い, その特異性と定量性の評価を行った. ハイブリッド型 DNA コンピューターによる情報処理は, 一般に, エンコードと DNA コンピューティングの大きく 2 つのステップに分けられる. エンコードのステップでは, 解析対象である入力情報が正規直交配列から構成された内部コードを用いて符号化される. その後, 符号化された情報はハイブリッド型 DNA コンピューターの分子計算部の CPU が備えている命令を用いた DNA コンピューティングにより処理される. エンコードのステップで用いられる分子反応は, 入力情報の形態により異なり, 解析の具体的内容に大きく依存する. それに対して, DNA コンピューティングのステップで用いられる分子反応は分子計算部の CPU の命令セットが同じである限り普遍である.

遺伝子発現解析におけるエンコードのステップでは, 遺伝子の転写産物量の分布を対応する内部コードを表現する DNA 分子の量の分布に特異的かつ定量的に変換することが必要とされる. そこで, マウスおよび酵母の約 100 個の遺伝子を用いて, エンコード反応の特異性と定量性の評価を行なった. 特異性は, 遺伝子同定配列をもつプライマーによる cDNA の PCR および単一の遺伝子同定配列の入力を用いたエンコード反応の実験により評価した. cDNA の PCR の実験では正しい長さの増幅産物のみが得られ, 単一の遺伝子同定配列入力実験では対応する内部コードへの変換のみが観測された. これらのことから, エンコードのステップの特異性が確認された. 定量性は, エンコードの際のライゲーション反応の効率が入力分子の配列と濃度に対してどのように依存性するかを調べることにより評価した. 反応時間が短い場合, 融解温度が一様かつ自己二次構造を形成し難い配列であっても, 反応効率は配列に対する依存性を示したが, 十分な反応時間後にはいずれの配列もほぼ 100% のライゲーション反応効率で内部コードに変換された. 変換テーブルを表現する DNA 分子が大過剰の条件で反応が行なわれているため入力分子はほぼすべて内部コードに変換され, 入力分子の濃度に対応した濃度の内部コードが生成された. これらのことから, ライゲーション反応が十分に進行する条件では定量的なエンコードを行なうことができることが確認された.

遺伝子発現解析における DNA コンピューティングのステップでは, まず感度を上げるために, エンコードのステップで生成された内部コード DNA 分子の増幅が行なわれ, その後に情報解析に必要な様々な計算反応が実行される. 最も簡単な解析は発現頻度分布の解析で, その場合は単に内部コードをデコードして遺伝子の同定と定量を行なう計算反応だけが実行される. 遺伝子の発現パターンの

判定などのより複雑な情報解析も、基本的には発現頻度分布の解析で使用される計算反応の組み合わせである。そこで、内部コードの増幅とデコードを行う計算反応の特異性と定量性の評価を行った。実験は、平成 15 年度の研究において実験誤差の範囲内で増幅効率が一樣であることが確認された約 100 種類の内部コード DNA 分子を用いて行った。単一の内部コード DNA 分子を用いて増幅およびデコード反応を行った結果、対応する単一のコードのみが得られ、反応の特異性が確認された。また、濃度既知の複数の内部コード DNA 分子の混合物を増幅・デコードして定量した結果、最初の量と増幅・デコード後の定量値との関係が内部コードにより異なること、両者の関係が比較的揃った 3 つのグループに分かれることなどがわかった。この内部コードごとの関係は独立した実験を繰り返しても再現性があり、同一の内部コードを使用する限り、補正により定量性の高い結果を得ることができることがわかった。

N. Nitta and A. Suyama, Autonomous biomolecular computer modeled after retroviral replication, *Proc. of DNA9*, 180-189 (2003).

Y. Ogura, T. Kawakami, F. Sumiyama, A. Suyama, and J. Tanida: Parallel translation of DNA clusters by VCSEL array trapping and temperature control with laser illumination, *Proc. of DNA9*, 19-27 (2003).

陶山明: DNA コンピュータとその応用, *ゲノム医学*, 3 (2), 223-228 (2003).

陶山明: DNA コンピュータ, 薄膜・表面物理セミナー「有機分子ナノテクノロジー」AP032326, pp.53-58, 応用物理学会 (2003).

陶山明: 自律的に動作する in vivo DNA コンピュータ, *細胞工学*, 22 (11), 1244-1249 (2003).

陶山明: DNA コンピュータで生命の謎を解く, *細胞工学*, 22 (8), 882-886 (2003).

陶山明: 生命体は分子コンピュータである, *細胞工学*, 22 (5), 570-572 (2003).

陶山明: 汎用型 DNA コンピュータを目指して, *細胞工学*, 22 (3), 348-352 (2003).

陶山明: 超並列 DNA コンピュータの誕生: エーデルマンの実験, *細胞工学*, 22 (1), 75-79 (2003).

#### **【平成 16 年度】**

平成 15 年度において特異性と定量性の評価を行ったハイブリッド型 DNA コンピュータを用いた遺伝子発現解析法の定量性を向上させることを行った。解析結果の定量性にはエンコードおよび増幅・デコードの各ステップの定量性が影響する。平成 15 年度の研究において、基本的にはこれらのステップの定量性が確認されたが、必ずしも十分に満足できるものではなかった。十分な定量性を得るために必要とされるエンコード反応条件の制約が厳しいことに加え、内部コードの増幅率を実験で得られた係数で補正することが必要であった。そこで、エンコードおよび増幅・デコードの各ステップの反応をより詳しく調べることにより、定量性を向上させるための簡便かつ確実な方法の開発とその評価を行った。

エンコードのステップの定量性を左右する大きな要因は、エンコードのためのライゲーシヨ

ン反応の効率の遺伝子同定配列依存性である。そこで、その依存性を酵母の 100 個の遺伝子の同定配列 DNA オリゴ (30 塩基長) を用いて詳細に調べた。測定結果の実験誤差を小さくするために、平成 15 年度の方法を改良した新しい実験方法を採用した。実験の結果、遺伝子同定配列の融解温度が揃っているにもかかわらず、配列により有意に反応効率が異なることがわかった。配列に関係する性質、たとえば、ライゲーション部位の塩基対スタックの安定性、その部位に隣接する塩基の種類、両側の配列部分の安定性などとライゲーション反応効率との関係を調べたが、顕著な関係は見出されなかった。また、エンコードのための変換テーブル分子の活性の非一様性にも原因があることが示唆された。変換テーブル分子のリン酸化の割合、ライゲーション反応に寄与できる正しい構造を取っている割合などがすべての遺伝子同定配列に対して同一であるかどうか不確かであることがわかった。これらのことから、多数の遺伝子について、遺伝子同定配列の設計を工夫することによりエンコード反応効率を一様にするのは容易でないことがわかった。

エンコードのためのライゲーション反応の効率は遺伝子同定配列に依存したが、いずれの遺伝子でも同定配列 DNA オリゴの濃度に比例することがわかった。そこで、この性質を利用してエンコード反応効率の遺伝子同定配列依存性を補正する、規格化エンコード法を開発した。この方法を用いると、変換テーブル分子の活性の不揃いに起因する場合であっても補正が可能である。また、内部コードの増幅効率やデコード効率のばらつきも補正される。

規格化エンコード法では、発現解析を行う cDNA サンプルだけでなく、同じ変換テーブル分子を含む反応液を用いて参照溶液のエンコードも行う (図 S1)。参照溶液中には解析対象遺伝子の同定配列を持つ DNA オリゴが一定の濃度で含まれている。その後、両者を増幅・デコードし、ユニバーサル DNA チップにハイブリダイズして定量を行う。cDNA サンプルの定量値を参照溶液の対応する配列の定量値で補正することにより、cDNA を正確に定量することができる。補正は数値的に行うことも可能であるが、デコードの際に cDNA サンプルと参照溶液の反応産物を異なる蛍光色素でラベルすると、競合ハイブリにより直接補正することも可能である。

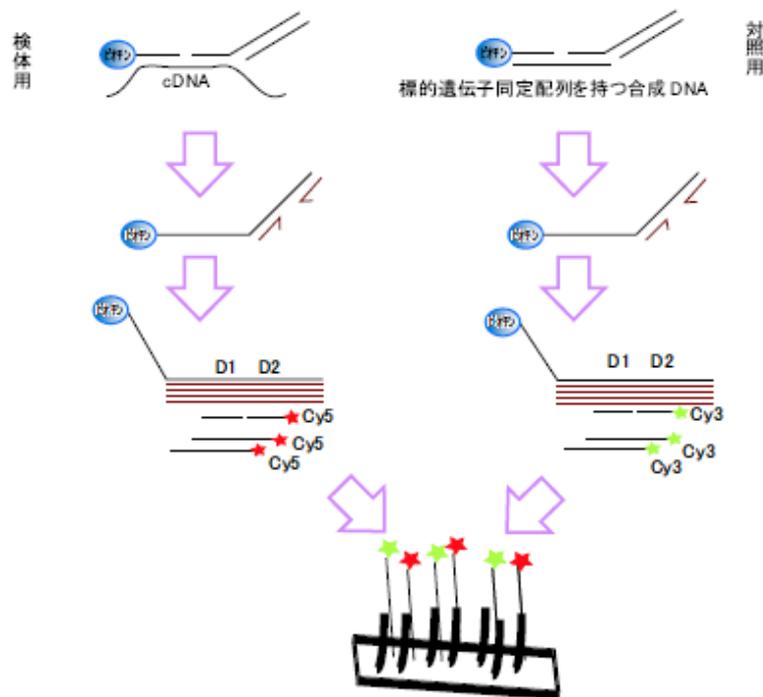


図 S1 規格化エンコード法

規格化エンコード法により，エンコード反応効率の非一様性などが補正できる理由を以下に示す．サンプル溶液中の遺伝子  $i$  の cDNA 濃度を  $C_S(i)$  とする．エンコード反応での遺伝子  $i$  の変換効率を  $\gamma(i)$  とすると，遺伝子  $i$  の cDNA がエンコードされて生成される内部コード DNA の量は  $\gamma(i)C_S(i)$  となる．ただし，ライゲーション反応が Michaelis-Menten 型で，基質の濃度が Michaelis 係数よりも低いとする．エンコードされた内部コード DNA を  $n$  サイクルの PCR で増幅すると， $\beta_{PCR}(i)\gamma(i)C_S(i)\exp(\alpha(i)n)$  の PCR 産物が得られる．ただし， $\alpha(i)$  は遺伝子  $i$  に対応する内部コード DNA の増幅率（後で述べる内部コード DNA 配列である DCN の選択により  $i$  依存性は小さい）， $\beta_{PCR}(i)$  は適当な比例係数である．その後のデコードの効率を  $\beta_{DCD}(i)$ （この  $i$  依存性も小さい）とすると，チップへのハイブリダイゼーション溶液中の標的産物量は  $\beta_{DCD}(i)\beta_{PCR}(i)\gamma(i)C_S(i)\exp(\alpha(i)n)$  となる．同様に，参照用溶液については，すべての遺伝子  $i$  に対して同じ濃度  $C_R$  の合成 DNA オリゴを使用するので，チップへのハイブリダイゼーション溶液中の標的産物量は  $\beta_{DCD}(i)\beta_{PCR}(i)\gamma(i)C_R \exp(\alpha(i)n)$  となる．サンプルと参照用の両溶液からのデコード産物溶液を適当な量比で混合し，競合ハイブリさせると，測定される蛍光強度比は

$$\frac{\beta_{DCD}(i)\beta_{PCR}(i)\gamma(i)C_S(i)\exp(\alpha(i)n)}{\beta_{DCD}(i)\beta_{PCR}(i)\gamma(i)C_R\exp(\alpha(i)n)} = \frac{C_S(i)}{C_R}$$

に比例することになる．したがって，エンコード反応の効率の非一様性などは相殺される．比例係数の値は不確定なので，蛍光強度の比から直接に  $C_S(i)$  の値を決定することは難しい．しかし，サンプル溶液中に既知濃度のサンプル（合成 DNA あるいは可能なら cDNA でも良い）を入れておき，それらに対する蛍光強度比から作成した検量線を用いれば， $C_S(i)$  の絶対定量を行うことができる．

規格化エンコード法の定量性を評価するために，遺伝子同定配列を持つ濃度が既知の 30 塩基長 DNA オリゴの混合溶液を定量する実験と，ガラクトース培地で培養した出芽酵母から調製した cDNA を定量する実験を行った．cDNA サンプル中の各遺伝子の cDNA の量は別途，定量的 PCR により決定した．規格化エンコード法を用いると，遺伝子同定配列 DNA オリゴマー混合サンプルの各 DNA の濃度を正確に定量できることがわかった（図 S2）．また，cDNA サンプルについても，平成 15 年度までの方法に比した両者の一致度が大幅に改善された（図 S3）．ただし，まだ十分な一致が得られているとは言えない．その原因としては，定量的 PCR による cDNA の定量そのものの誤差が少なくとも 30% 以上と大きいこと，合成 DNA より長い cDNA が形成する二次構造がエンコード反応の効率に影響することなどが考えられる．

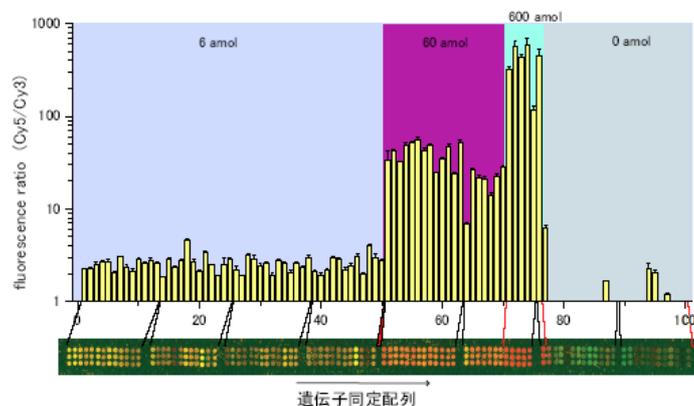


図 S2 100 種類の DNA オリゴマー混合サンプルの定量

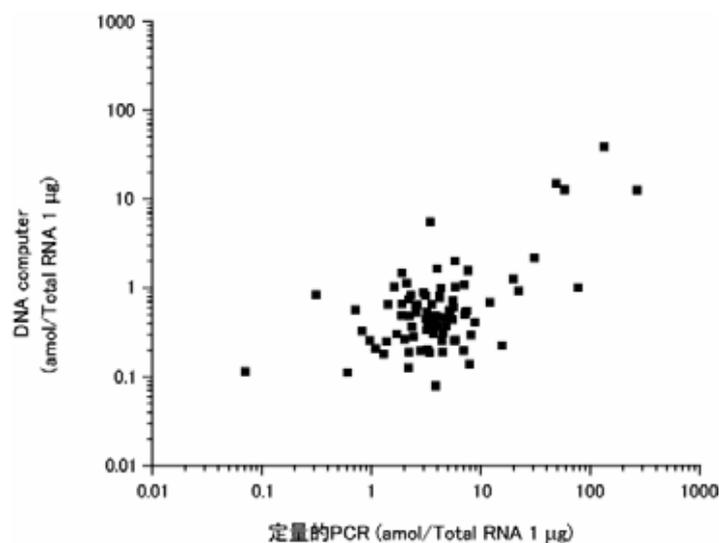


図 S3 出芽酵母 cDNA の絶対定量（定量的 PCR との比較）

増幅・デコードのステップの定量性は、それらの効率の内部コード配列依存性に左右される。規格化エンコード法を用いれば、それらの効率の違いも原理的には補正が可能であるが、その違いが大きいと、増幅のステップでデータが失われてしまうことが起こる。したがって、可能な限り効率がそろっていることが望ましい。そこで、4 個の正規直交配列を連結して作成した 2 桁の DNA コード化数を 600 種類合成し、それらについて増幅・デコードの効率を測定し、より効率のそろった 300 種類の DCN 配列を選択することを行った。それら 300 種類の DCN 配列と、残りのより効率のそろっていない 300 種類の DCN 配列について、定量性の比較を行った。10 倍ずつ濃度が異なる 4 段階の濃度の DCN 配列 DNA 分子を混合した溶液を作製し、増幅・デコードしてから定量を行い、濃度分布に変化がないか調べた。その結果、より効率のそろえた 300 種類の DCN 配列の混合液の方が濃度分布を崩さずに増幅・デコードされ、高い定量性が得られることがわかった（図 S4）。

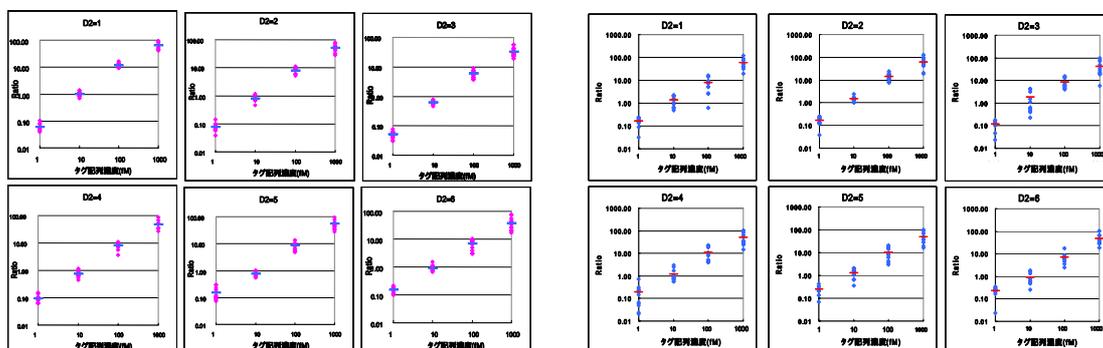


図 S4 内部コードの増幅・デコードの定量性  
 効率がよりそろった 300 種類 (左) とそうでない 300 種類 (右) の比較

今後、規格化エンコード法の改善をさらに進め、定量的 PCR と同程度、あるいはそれ以上の精度を持つ、絶対量の定量を多数の遺伝子について同時かつ短時間に行うことができる、分子コンピューティング技術を利用した遺伝子発現解析法を確立する。そのために、定量的 PCR の実験方法を改良して実験誤差を小さくし、cDNA の再定量を行う。また、より長い遺伝子同定配列を持つ変換テーブル分子を用いた、cDNA の二次構造の影響をより受けにくいエンコード反応により cDNA の定量を行う。これらの結果を比較検討することにより、規格化エンコード法の定量性の再評価を行い、cDNA の絶対量の精度を向上させる。さらに、他の方法では不可能な、DNA コンピュータによる方法のみが有する演算性を利用して、遺伝子の発現パターンの判定ができることを示す予定である。

N. Nitta and A. Suyama: Autonomous biomolecular computer modeled after retroviral replication. *Lect. Notes Comput. Sc.*, 2943, 203-212 (2004).

Y. Ogura, T. Kawakami, F. Sumiyama, A. Suyama and J. Tanida: Parallel translation of DNA clusters by VCSEL array trapping and temperature control with laser illumination. *Lect. Notes Comput. Sc.*, 2943, 10-18 (2004).

陶山明: DNA コンピュータとナノテクノロジー. 細胞工学, 23 (2), 241-246 (2004).

陶山明: DNA コンピュータの現状と将来. 臨時別冊・数理科学 SGC ライブラリ 31, 129-135 (2004).

陶山明: バイオコンピューター・DNA デバイス. 新訂版・表面科学の基礎と応用, 日本表面科学会編, pp.1365-1367, エヌ・ティー・エス (2004).

J. A. Rose and 陶山明: DNA 二重らせんの安定性を解く その理論と応用. 東京大学バイオイ

ソフトウェア集中講義, 高木利久監修, pp.60-67, 羊土社 (2004).

M. Takinoue and A. Suyama: Molecular reactions for a molecular memory based on hairpin DNA. *CBI J.*, 4 (3), 112~120 (2004).

## タグとアンチタグのシステムの忠実度

John A. Rose(東京大学・大学院情報理工学系研究科)

### 【平成14年度】

TAT システム(タグとアンチタグのシステム)のエラーを見積もるために,一般的な条件のもとで平衡論的な解析を行った.すなわち,入力が希釈されていない場合のエラーが最小になる温度は,期待される二本鎖の融解温度と期待されない二本鎖の融解温度の間に位置することが分かった.これは従来の stringency と呼ばれる条件と合致している.一方,入力が希釈されている場合,エラーの極小値は存在せず, stringency が当てはまらない.

J. A. Rose, R.J. Deaton, M. Hagiya, A. Suyama: An Equilibrium Analysis of the Efficiency of an Autonomous Molecular Computer, *Physical Review E*, Vol.65, No.2-1, 2002, 021910, pp.1-13.

John A. Rose, Russell J. Deaton, Masami Hagiya, and Akira Suyama: The Fidelity of the Tag-Antitag System, *DNA Computing, 7th International Meeting on DNA-Based Computers, DNA7, Tampa, FL, USA, June 2001, Revised Papers, 2002, LNCS Vol. 2340*, pp.138-149.

John. A. Rose, Russell J. Deaton, Masami Hagiya, and Akira Suyama: PNA-mediated Whiplash PCR, *DNA Computing, 7th International Meeting on DNA-Based Computers, DNA7, Tampa, FL, USA, June 2001, Revised Papers, 2002, LNCS Vol. 2340*, pp.104-116.

J. A. Rose, M. Hagiya, R. J. Deaton, and A. Suyama: A DNA-based in vitro Genetic Program. *J. Biol. Phys.*, **28**, 493-498 (2002).

J. A. Rose, M. Takano, and A. Suyama: A PNA-mediated whiplash PCR-based program for in vitro protein evolution. *Preliminary Proc. of The Eighth International Meeting on DNA Based Computers*, pp. 5-18 (2002).

### 【平成15年度】

昨年度の成果を発展させるとともに,以上の解析に基づいて,高い忠実度を持つ TAT システムを, 遺伝的アルゴリズムを用いて求めた.

John A. Rose and Masami Hagiya and Akira Suyama: The Fidelity of the Tag-Antitag System 2: Reconciliation with the Stringency Picture, *Proceedings of the 2003 Congress on Evolutionary Computation (CEC'03)*, 2003, pp.2740-2747.

J. A. Rose, M. Takano, M. Hagiya, and A. Suyama: A DNA-computing-based genetic program for in vitro protein evolution via constrained pseudomodule shuffling, *Genetic Programming and Evolvable Machines* 4, 139-152 (2003).

J. A. Rose, M. Takano, and A. Suyama: A PNA-mediated whiplash PCR-based program for in vitro protein evolution, *LNCS*, **2568**, 47-60 (2003).

#### 【平成 16 年度】

これまでの研究成果を, DNA チップの設計に応用するための研究を進めた.

John A. Rose, Masami Hagiya and Akira Suyama: Equilibrium Model of DNA Chip Hybridization Error, The 15<sup>th</sup> International Conference on Genome Informatics, 2004, poster presentation.

### マイクロチップのための微量液体制御機構の開発

藤井輝夫・山本貴富喜(東京大学・生産技術研究所)

#### 【平成 14 年度】

微小流路内における DNA ハイブリダイゼーション反応への応用可能性を検討するため, 空気圧駆動によって, 液滴プラグ(液滴)を操作するシリコン樹脂製マイクロチップ(3 cm x 4 cm)と, 液体インキュベーション用の ITO(Indium Tin Oxide)製ヒータ構造をもつガラス基板(9 cm x 5 cm)からなるマイクロ生化学システムを構築し(図 2), その評価実験を行った. 評価実験では, 蛍光染色された 1 本鎖(56 mer)およびその相補鎖の液滴 (容量:300 pL 以下)(DNA 濃度:1 pmol/ mL)を, 生成し, 両液滴を合体・混合させた. 両液体プラグの接触面において蛍光強度のピークが確認できることから, 本マイクロ生化学システムが, ハイブリダイゼーション反応へ応用可能であることが確認できた. 現状での課題としては, 蒸発による液体プラグ内の DNA の濃度変化と, 蛍光色素の消光および微小流路壁面への吸着が確認されているので, 今後の検討を要する.

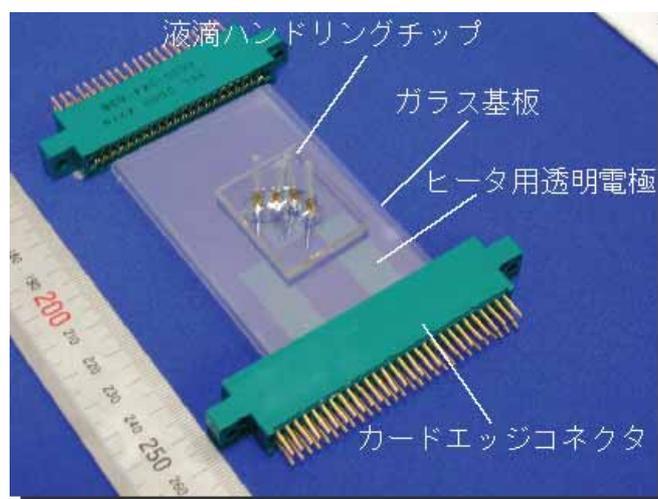


図2: 微小液体プラグ操作マイクロ生化学システムのデザイン

Takatoki Yamamoto, Teruo Fujii and Takahiko Nojima: "PDMS glass hybrid microreactor array with embedded temperature control device. Application to cell-free protein synthesis", Lab on a Chip, 2, 197-202, 2002.

**【平成15年度】**

マイクロチップ上での分子計算実現に向けての基盤技術となる、微量液体制御機構の開発にあたった。シリコンゴム製マイクロチップ上の疎水性ベントバルブを用いた微量液体制御をキャピラリ電気泳動に必要な液体操作に応用することで、微量試料プラグ(約 300 pL)の生成から、分離マトリクスとの合一、泳動分離までの操作を3分程度で実現することに成功した(図1参照)。また、マイクロチップの分子計算への具体的な応用事例として、DNAとPNA (Peptide Nucleic Acid)からなる、分子メモリの書き込み・読み出し操作マイクロチップを試作した(図2参照)。チップでは、書き込み操作にあたるDNA-PNA結合反応、読み出し操作にあたる制限酵素反応および泳動分離を、電気浸透流・電気泳動といった電気制御による流体操作で行なうことで、書き込み・読み出し操作の自動化を実現した。3塩基PNA、 $\phi$ X-174ファージDNA、制限酵素としてHae IIIを用いた評価実験では、5分以内に全操作を完了できることを確認した。これは、従来のマイクロチューブとゲル電気泳動を用いた場合に比べて操作時間を20分の1程度に短縮できたことになる。今後は、分子メモリを用いたアクエアスアルゴリズムのチップ上での実現へ向けて研究を進める予定である。

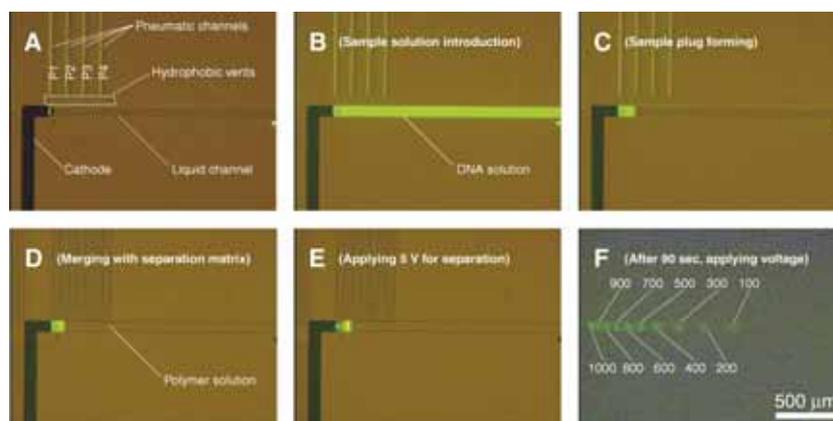


図1. マイクロチップ上の微量液体制御機構によるキャピラリ電気泳動操作



図 2 . 分子メモリ書き込み・読み出し用マイクロチップ

[1] S. Kaneda and T. Fujii; "Combining Droplet-Based Liquid Handling and On-Chip Capillary Electrophoresis With a New Sample Injection Method", Proc.  $\mu$ TAS 2003, pp. 1279-1282, October, (2003), Squaw Valley, California, USA.

[2] 金田 祥平, 藤井 輝夫; "マイクロ生化学システムにおける表面技術", 表面技術, 54, pp.319-314, (2003).

[3] S. Kaneda, K. Ono, T. Yamamoto and T. Fujii; "Small Volume Droplet-Based Liquid Handling Device for DNA Identification and Quantification by Electrophoretic Separation", Proc Nanotech 2003, (2003), Montreux, Lausanne, Switzerland.

[4] 金田 祥平, 小野 航一, 藤井 輝夫; "マイクロ生化学システムの新展開", 第9回創発システム・シンポジウム資料, (2003).

#### 【平成 16 年度】

昨年度までに開発を行ってきた微量液体制御機構を持つキャピラリ電気泳動用マイクロ流体デバイスの実用化に向け、デバイス上での電気泳動操作に必要となる、空気圧および印可電圧を制御するシステムを構築した。これにより、サンプル溶液交換操作を除く、デバイス上での電気泳動操作の自動化が可能となった。

また、昨年度に試作した、DNA と PNA を用いた分子メモリ書き込み・読み出し操作用マイクロ流体デバイスでは、書き込み操作での反応条件の最適化を行いつつ、デバイス上にオンチップレンズ構造を集積化し、読み出し操作の自動化に向けた検討を行った。

[1] 金田祥平, 藤井輝夫; "ソフトリソグラフィーを用いたマイクロ・ナノ構造の製作技術", 高分子, 53, pp.341, (2004).

[2] K. Mogi, S. Kaneda, K. Ono, T. Fukuba, T. Fujii: "A Microfluidic Device of Write-in and Read-out Operations of a Molecular Memory", Proc.  $\mu$ TAS 2004, pp569-571, September, (2004), Malmo, Sweden.

## DNA コンピュータのためのコンパイラ

萩谷昌己(東京大学・大学院情報理工学系研究科)

### 【平成 14 年度】

分子反応の設計に関しては、陶山たちのハイブリッド型 DNA コンピュータのためのコンパイラの開発を進めた。プレートやチップ(ラック)のテーブルへの割り付けはレジスター割り付け、磁気ビーズ・ユニットやディスペンサなどのモジュールのスケジューリングは命令スケジューリングと考えることにより、既存のコンパイラ技術を反応制御の自動スケジューリングへ応用することを試みた。特に、全体の反応時間を最小化するために整数線形計画法が応用できることを見出し、この方向に従ってスケジューリングのアルゴリズムの定式化を進めた。

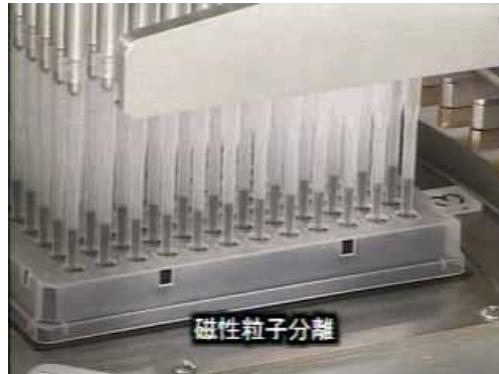
### 【平成 15 年度】

昨年度に引き続き、ハイブリッド型 DNA コンピュータのためのコンパイラの開発を進めた。ANP-96 (Algorithmic NA Processor)は DNA 計算の実験を自動的に行うロボットであり、与えられたプログラムに従って複数の実験操作を同時に実行することが可能である。DNA 計算の実験操作は種々の制約のもとで実行され時間もかかるので、複数の実験操作を自動的かつ効率的に実行することが重要である。

このロボットは、「入力」である複数の与えられた溶液から始まり、以下のような操作を繰り返し適用することで、新たな溶液(これも複数)を作り出す。この最終的な「出力」である溶液を調べることにし、実験が終了する。

- (1) 特定の溶液を混合して、新しい溶液を作る(Mixing, 懸濁)。
- (2) 溶液から磁気ビーズという仕掛けにより、ある物質(溶液と考えてよい)を取り出すこと(Magtration, 磁性粒子分離)。
- (3) 溶液を特定の温度にまで暖めること(Warming, 温度制御)。
- (4) 溶液を特定の温度で一定時間維持すること(Wait, 維持)。

溶液は通常のプログラミング言語における「値」と考えることが出来る。この「値」を保持する「変数」に相当するものとして、プレートとチップがある。プレートは溶液を入れる器である(下図の穴のあいた板)。またチップとはガラス製の先(下)細りの管(下図の複数の管)であり、溶液を保持することが出来る。実際にはチップは複数の管からなり、チップラックというチップを納める複数の穴をもつ容器に置かれており、チップに対する操作はこのチップの 1 セットに対して同時に行われる。プレートも同様に、複数の管に対応する複数の穴からなり、この穴の各々に溶液が入る。



プレートとチップの個数には事実上制限はないが、ロボットは上記の操作を有限(8 個)の実験場所(テーブル)で行うようになっている。また上記の(3)が可能なテーブルは二つしかなく、さらに (1) や (2) を行うための IMU という装置は一つしかない。以下がロボット本体の主要モジュールである。

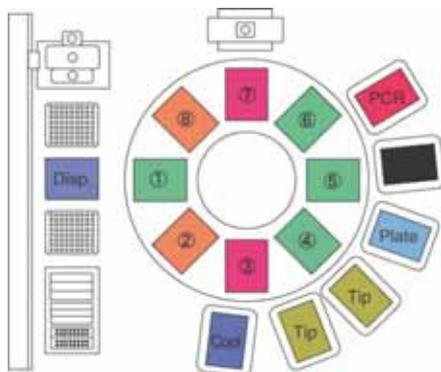
IMU (Integrated Magtration Unit, 下左図の のテーブルの上の装置)

ストック(下左図の Plate および Tip と書かれた装置)

ディスペンサ(下左図の Disp.)

ターンテーブル(下右図の丸いテーブル, 下右図も参照)

ロボットアーム(下右図参照)



このロボットは、与えられたプログラムに従って複数の実験操作を並列に実行することができる。しかし、現在の ANP-96 のプログラミング環境は、実験に本質的ではない低レベルな記述を必要とするため多くの手間を必要とし、誤ったプログラムにはロボットを破壊する危険もある。特に、プログラマは有限のテーブルを無駄なく割り当てるとともに、温度制御等の時間のかかる命令を効率よくスケジューリングしなければならない。

我々は以上のようなプログラミングを自動化するために、テーブルのアロケーションと命令のスケジュー

ーリングを含む問題を, ANP-96 に依存しない一般的な抽象度で記述する枠組みを開発するとともに, その枠組みに基づく制御コード生成系を実装した.

特に, この枠組みでは, 各操作におけるリソースの受け渡しに関する記述を簡潔に表現することができる. また, 上述の問題に対する最適な解を与える手法として, コンパイラ分野で提案された整数線形計画法による手法を利用した. この手法は処理時間が長く, したがって小規模のプログラムにしか適用できないのが欠点であるが, ANP-96 においては, 一般にプログラムは比較的小規模であり, その実行回数とコストを考慮すると, 時間をかけて最適化する価値があると考えられる.

阿部正佳, 萩谷昌己: 整数線形計画法を用いた DNA コンピュータ制御コードの生成, *情報処理学会論文誌プログラミング*, Vol.45, No.SIG9(PRO22), 2004, pp.1-13.

(特許出願) 阿部正佳, 萩谷昌己: 「分子計算装置, 分子計算計画設計装置, 及び分子計算方法」, 2004/1/16, 2004-009626.

#### **【平成 16 年度】**

本年度は, 昨年度までに開発したアルゴリズムを実際に ANP-96 に実装するための検討を行っている. 現在の ANP-96 のソフトウェアは, 次の四つのモジュールに対応する四つのデバイス・ドライバ (bios) と, それらを制御するためのタスク・マネージャから成り立っている.

IMU

ストッカ

ディスプレイ

ターンテーブルおよびロボットアーム

タスク・マネージャは, 表ソフトウェアに類似したインタフェースを持ち, 人間が直接的にプログラムを書くことを念頭において作られており, 本研究で開発したコンパイラが出力する制御コードを直接的に実行することは難しい.

そこで, 現在, ANP-96 の開発者 (Precision System Science 社) と交渉して, タスク・マネージャのソースコードの取得し, それをもとに, 本研究のコンパイラが出力する制御コードを直接的に実行することのできる新しいタスク・マネージャを開発することを計画している.

Seika Abe, Masami Hagiya and Takao Nakajima: Code Generation for a DNA Computer by Integer Linear Programming, *Proceedings of the 2004 IEEE Conference on Cybernetics and Intelligent Systems*, Singapore, 1-3 December, 2004, pp.268-273.

## 5. 今後の課題

おおむね、各項目に関して、当初の計画に従った研究成果を得ることができた。特に、分子プログラミングの観点からは、以下の研究成果が顕著であると考えられる。

### 望ましい構造を作る配列の設計

DNA タイルの自己組織化による二次元パターンは、DNA が作る高次構造の典型的なものである。村田は、自己組織化がより正確にかつ効率的に進むように、DNA タイルの新しい設計方法を提案した。プロテクタと呼ばれる構造体を DNA タイルの上に重層する。DNA タイルの自己組織化が正しく行われたときのみプロテクタがはずれ、さらなる自己組織化が可能になる。従って、誤った自己組織化はほとんど進まない。結果として、正確性と効率の両方を実現することができた。今後は、DNA を用いて実装を行う計画である。

### 自在に構造変化する配列の設計

萩谷は、DNA 配列の二次構造の作る地形を解析することにより、二次構造間エネルギー障壁を効率よく求めるアルゴリズムを開発した。このアルゴリズムを用いることにより、望まれる構造変化が速やかに起き、望まれない構造変化が阻害されるような配列を設計することが可能になった。さらに、浅沼(萩谷班)が開発している光機能性超分子を、以上の設計方法に取り込むことを試みている。

### 反応の並列化

萩谷は、陶山たちのハイブリッド型 DNA コンピュータのためのコンパイラの開発を進めた。プレートやチップのテーブルへの割り付けはレジスター割り付け、磁気ビーズ・ユニットやディスクペンサなどのモジュールのスケジューリングは命令スケジューリングと考えることにより、既存のコンパイラ技術を反応制御の自動スケジューリングへ応用することに成功した。特に、整数線形計画法を用いることにより、リソースの割り付けと命令のスケジューリングの両方を最適化することに成功した。

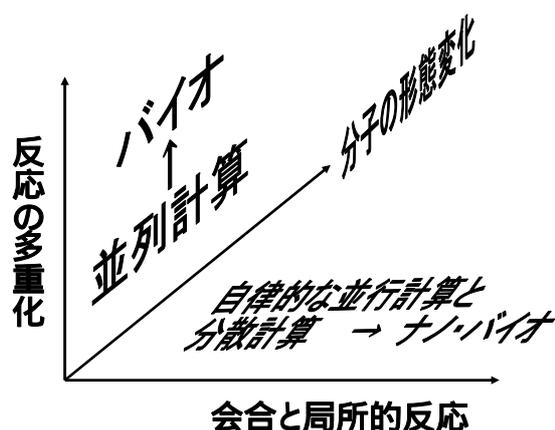
以上の研究成果の中で、特に村田の成果は顕著であるため、領域全体の中で自己組織化に特化した計画研究を立てることとなった。そのため、本研究班では、自己組織化の次に来るべき研究テーマとして、自己組織化と形態変化の融合を取り上げるのが適当であると考えた。

自己組織化と形態変化を融合することにより、新たな分子コンピューティングの展開が期待される。すなわち、分子間の局所的なインタラクション(近傍の分子とのみ可能な反応)について検討を行い、最終的には、形態変化する分子による並行計算と分散計算のモデルの構築を目指す。具体的には、DNA で作られた歩道を歩く DNA Walker の設計と実現を進めるとともに、DNA を用いてアモルファス・コンピューティングの計算粒子を実現する方法について検討する。

上述した「分子による分散計算」を実現するためには、その基盤として「分子による自律的な並行計

算」を究める必要がある。本研究班ではこれまで「分子による並行計算」を、「反応の多重化」、すなわち、独立した複数の反応(具体的には別々の試験管の中で独立に進む複数の反応)による並行計算と捉えていたが、一つの試験管内で互いにインタラクションしつつ自律的に進む複数の反応から成るシステムは、「分子による自律的な並行計算」を実現していると考えられる。すなわち、試験管内の大域的なインタラクションと、分子内の形態変化という二種類の反応により並行計算が実現される。形態変化する分子は、他の分子から入力を受け取って形態を変化させ出力を行う。本課題では、このような形態変化する分子によるネットワークの構築を進める。これにさらに局所的なインタラクションを加えることにより、上述の分散計算の実現を目指す。

自己組織化に代わって、「分子による自律的な並行計算と分散計算」を本研究班の柱の一つとして設定することとしたため、全体の班のイメージは以下ようになる。反応の多重化は「並行計算」から「並列計算」に改めた。



「分子による自律的な並行計算」として、具体的には、以下の研究計画にあるように、ヘアピンとバルジによる並行計算、レトロウィルスによる並行計算、翻訳系による並行計算の三つの研究テーマを進める。

また、上の最後にあげた研究成果にあるように、萩谷は、陶山の開発しているハイブリッド型 DNA コンピュータのためのコンパイラの開発を行っているが、同様の技術をマイクロチップ上の反応制御に対しても開発すべきであると考えられる。すなわち、マイクロ流体デバイス上の反応制御を効率的に行うために、マイクロ流路とその制御をシステムティックに設計する方法論を検討して行くべきであると考えた。

以上のような検討の結果、次年度以降の研究計画を以下のように立案した。

#### 1. 分子の形態変化を利用した分子マシン

**形態変化する DNA 分子の設計方法(萩谷・Rose)【平成 17 年度】**ヘアピンやバルジの開裂を活用した

分子マシンの実装結果により、形態変化経路の解析手法を評価しその改良を行う。また、二次構造だけでなく3次構造も考慮した解析について検討する。【平成 18 年度】それまでの分子マシンの設計手法をまとめ、配列設計の事例も含めて、「分子マシンの作り方」というような形にまとめる。

**分子マシンの光制御を目指した光機能性超分子の構築(浅沼)【平成 17 年度】**trans-体での二重鎖の安定化と cis-体での不安定化を同時に両立させるアゾベンゼンの合成を目指す。またアゾベンゼンを DNA に導入するためのリンカーを最適化し、 $T_m$  の増大を図る。更にアゾベンゼンとは逆のスイッチングをするスピロピラン分子を導入した光応答性 DNA の合成も検討する。【平成 18 年度】光応答性 DNA を用いて光駆動型分子マシンを構築する。またアゾベンゼンを導入した光応答性 DNA エンザイムを開発し、m-RNA 切断の照射によるスイッチングを検討する。更に光応答性 DNA エンザイムを応用したロジックゲートを構築する。

## 2. 分子による自律的な並行計算と分散計算

**ヘアピンとバルジによる並行計算(萩谷)【平成 17 年度】**ヘアピンやバルジの開裂による形態変化に基づいた分子マシンのネットワークの構築を目指して、そのコンポーネントとなる分子マシンの設計・実装を行う。【平成 18 年度】前年度に実装したコンポーネントを用いて実際に分子マシンのネットワークを構築し、分子による自律的な並行計算の実現を行う。

**レトロウイルスによる並行計算(陶山)【平成 17 年度】**レトロウイルスがゲノムを複製する仕組みである逆転写・転写反応を利用して、一定温度の下で自律的に並行計算を実行する自律型 DNA コンピュータ(RTRAC: Reverse Transcription and Transcription-based Autonomous Computer)を開発する。RTRAC を用いて論理式の評価計算を行うことにより試験管内で自律的に遺伝子発現パターンの判定などの計算処理が行えることを示す。【平成 18 年度】萩谷らによる形態変化する核酸分子を利用して、RTRAC のプログラムを制御する仕組みを開発する。

**翻訳系による並行計算(横山)【平成 17 年度】**大腸菌の遺伝暗号翻訳システムを利用した「オートマトン」を実現する。翻訳系を利用することで、大腸菌 1 個体ごとに異なった演算を行えるシステムを構築できる。【平成 18 年度】引き続き in vivo オートマトンの開発を行う。最終的に、3 状態以上、入力長 10 の実現を目指す。

**DNA Walker(萩谷)【平成 17 年度】**DNA で作られた歩道を歩く DNA Walker の設計と実現を進める。【平成 18 年度】DNA Walker を発展させ、DNA を用いてアモルファス・コンピューティングの計算粒子を実現する方法について検討する。

## 3. DNA コンピュータとその制御

**DNA コンピュータのためのコンパイラ(萩谷)【平成 17 年度】**前年度に引き続き、整数線形計画法を用いたリソースの割り付けと命令のスケジューリングを最適化するアルゴリズムを、実際にハイブリッド型 DNA コンピュータ(ANP-96)へ実装する作業を進める。【平成 18 年度】実装したコンパイラに対して、他の自動ロボットへも応用可能なように、拡張および汎用化を行う。

**マイクロチップのための微量液体制御機構の開発(藤井)【平成 17 年度】**これまで開発を進めてきた(1)微量液体制御機構を有するマイクロチップと(2)電気泳動および電気浸透流を利用した分子輸送機構を有するマイクロチップについて反応系に重点をおき,双方の比較検討を行う。**【平成 18 年度】**17年度の比較検討の結果より,マイクロチップ上でのアクエラスコンピューティングの実現を目指す。

**マイクロチップ上の反応制御(萩谷)【平成 17 年度】**藤井が開発を行っているマイクロチップ上の反応制御を効率的に行うために,マイクロ流路とその制御に関してどのような問題点があるかを解析する。

**【平成 18 年度】**マイクロ流路とその制御をシステムティックに設計する方法論の開発を試みる。

なお,**翻訳系による並行計算(横山)**に関しては,今年度から準備研究を開始し,既に以下のような成果を得ている。

大腸菌の遺伝暗号翻訳システムを利用した簡単な「オートマトン」を実装した。最初に,AGGA,およびAGGUの4文字コドン認識するフレームサプレッサー-tRNA 遺伝子を構築し,大腸菌のプロモータ配列下にクローニングすることで,大腸菌内で発現させることに成功した。「1」を並べた文字列をコード化した塩基配列は,LacZ遺伝子内にクローニングし,サプレッサー-tRNA とともに大腸菌内で発現させた。この結果,文字列の表現にAGGAを用いたときに,3回までのフレームシフト・サプレッションに成功した。ただし,サプレッションの起きないはずの文字列でコロニーが着色するという問題が生じた。また,サプレッションの効率を上げるために,AGGコドンをLacZのN末端に2-4個並べたが効果が見られなかった。さらに,長い文字列を用いるためには,サプレッサー-tRNA の選択や,文字列のコード化の工夫などが必要である。

## 6. 研究費の使用状況

本研究班は,理論モデルの構築とその解析だけでなく実証実験も行っているため,研究費の多くは,主として実験設備の充実,合成 DNA や試薬などの消耗品,学生のアルバイト(実験補助)などに使用されている。

備品に関しては,DNA 関連の実験設備がその中心になっている。計算機としては,小規模のパソコンやプリンタに限られている。平成 14 年度は,陶山が脱臭式ドラフトチャンバ,ミリポア超純水システム,タイテック振とう培養器などを購入し実験設備を充実した。この他,岩崎が光学顕微鏡を購入している。また,浅沼がNMR 解析用のコンピュータを購入しているが,これも実験設備の一部と考えられる。平成 15 年度は,萩谷が遠心器,サーモサイクラー,インキュベーターシェーカーを購入,陶山は循環恒温水槽とDNA コンピュータの部品を購入し実験設備を充実した。藤井はマイクロリアクタ用のマイクロポンプ駆動回路を購入した。

実験設備に関しては各研究グループごとに整備している状況にある。今後,お互いに設備を融通し合い有効に活用することが課題であると考えている。