

## 「パラメータ制御方式による分子計算」

研究代表者： 大内 東（北海道大学大学院工学研究科）

研究分担者： 山本 雅人（北海道大学大学院工学研究科）

川村 秀憲（北海道大学大学院工学研究科）

### 【研究の背景と目的】

分子計算，特に，DNA を用いた計算において，計算の信頼性を向上することは重要な要素の一つである．本研究では，実験の信頼性に影響を与える様々なパラメータに着目し，それらのパラメータと実験の信頼性との関連を明らかにすることを目的とする．また，それらの結果を用いて，DNA 分子の濃度や形態変化等を制御する手法について確立することを目指す．

DNA 分子による計算(DNA コンピューティング)において，実験結果に影響を及ぼすパラメータは非常に多い．用いる DNA の塩基配列，DNA の種類や濃度，反応プロトコル(温度，バッファ，反応時間，他多数)などによって計算結果は著しく異なると言ってもよい．しかしながら，こういった様々なパラメータについての詳細な分析や，反応時間と結果の関係などの分析についての研究が行われていない現状がある．本研究では，これらの現状をふまえて，計算の信頼性向上を目的とし，大きく，塩基配列設計の問題，DNA 濃度と計算結果の関連，反応プロトコルの最適化，形態変化によるメモリの制御，といった点からアプローチする．

本年度は，具体的に以下の項目について研究を行った．

- (1) バルジループ構造をとるDNAの安定性に関するモデル化
- (2) 2-Step Search 法による塩基配列設計手法の検討
- (3) 状態遷移型 PCR の実現とシミュレーション
- (4) ヘアピン型メモリを用いたアクエアスコンピューティングの実現

### 【研究成果の概要】

本年度は，上記の項目毎に以下のような研究成果を得た．

- (1) バルジループ構造をとるDNAの安定性に関するモデル化

DNA コンピューティングにおいて，高信頼性，すなわち，計算精度の向上を目指した場合，塩基配列設計は大きな課題の一つである．これまでの塩基配列設計は，ミスハイブリダイゼーション(望まない二本鎖形成)しない配列設計のために，塩基配列間のずらしを考慮したハミング距離を一定以上に保つ配列を求める最適化問題に帰着して設計する手法が一般的であった．しかしながら，この方法では比較的安定な構造として知られているバルジループ構造をとる DNA の影響を考慮していないため，DNA 塩基配列の正しい評価ができない場合がある．本研究では，ループ部分の塩基が一つであるシングルバルジループ構造の安定性について検討した．具体的には，シングルバルジループ構造をとる DNA の融解温度( $T_m$ )を予測するために，Nearest-Neighbor モデルの拡張を行い，バルジループ部分配列の自由エネルギーを実験データに基づいて算出することを行った．しかしながら，バルジ部分が配列内での位置に存在するかによって，融解温度が大きく影響を受けることもわかった．このため，まず，バルジ部分の位置による影響をなくすために，バルジ部分が配列の真ん中にある場合について，部分

配列の自由エネルギーの算出を行った。部分配列の種類，すなわち，算出する自由エネルギーの値は全部で 64 種類あり，それらのすべてについて算出を完了した。この結果を利用するとバルジループ構造をとる可能性のある DNA 塩基配列の安定性について，融解温度の予測を利用することにより評価が可能となることが期待される(成果リスト[9]参照)。

また，DNA の片側の末端部分が固相上に固定されていた場合に，固定されていない場合と比較して，バルジループ構造をとる DNA の安定性が変化することを示し，固相上での DNA のハイブリダイゼーション反応を利用する DNA コンピューティングモデルを扱う際に注意が必要であることを実験によって示した(成果リスト[8]参照)。

## (2) 2-Step Search 法による塩基配列設計手法の検討

塩基配列設計問題を大別すると二つの性質の異なる問題になる。一つは，設計する塩基配列の本数を固定し，ある条件を可能な限り最適化する問題，もう一つは，ある制約条件を満たすような塩基配列の本数をできる限り増やす問題である。塩基配列設計手法は，遺伝的アルゴリズムや符号論に基づくものなど多くの手法が提案されているが，後者については，ランダム探索手法(ランダムに塩基配列を生成し，制約を満たしていれば設計配列として加える)が有効であることが知られている。本研究では，このランダム探索手法では，初期に選ばれる配列が最終的に得られる配列の本数に非常に大きな影響を与えることを示し，より多くの配列を設計可能な 2-Step Search 法を提案した。本手法では，ランダムに生成した配列が制約を満たしている場合，設計配列に加える前にその配列をできるだけ既に得られている設計配列と制約条件をぎりぎり満たすようになるまで変更する。この手法が有効であることを通常のランダム探索手法と比較することによって示した(成果リスト[5]参照)。

## (3) 状態遷移型 PCR の実現とシミュレーション

濃度制御 DNA コンピューティングの新しい計算モデルとして，状態遷移型 PCR(State Transition PCR(ST-PCR))を提案して，確率的な状態遷移モデルの実現を行った。現在の状態を保持する状態分子と状態遷移を行うための状態遷移分子を用いて，状態分子の反応を制御する。これまでの状態遷移モデルは，DNA のヘアピン形成を利用したものや制限酵素を利用したものなどがあつた。しかしながら，これらの手法では状態遷移を制御することが困難であったり，多数の状態遷移が困難であったりする問題点があつた。本研究で提案したモデルでは，状態遷移分子の濃度を制御することで，状態分子の遷移確率を制御できることを示した。提案モデルでは，状態遷移分子が変化しないように 3'末端側をアミノ化によって修飾すること，各状態を表す塩基配列として 15, 16 塩基が適切であること，また，PCR サイクルとして，伸長反応の際の温度を比較的高温で長時間かけることが良いことを実験的に確認した。さらに，状態遷移分子の濃度と状態遷移確率の関連を調べるために，シミュレーションモデルを構築し，シミュレーション結果と実験結果を比較することで反応プロトコルの改良を行った。(成果リスト[1][6]参照)

## (4) ヘアピン型メモリを用いたアクエアスコンピューティングの実現

一本鎖 DNA の内部に自分自身と相補的な配列が存在する場合は，DNA はヘアピン構造をとる。これを利用したメモリの構築を行った。ヘアピン構造をとっている DNA を入れた溶液に，ヘアピン構造の一部に相補的な配列(オープナー)を入れると相補的な部分がアニールすることによってヘアピン構

造が壊れる．ヘアピン構造をとっている時ととっていない時をビットの 0 と 1 に対応させることによって，4 ビットのメモリを構築した．各ビットに対応する相補配列を入れることでそのビットを 0 から 1 に変更することが可能となる．このメモリを構築し，正常に動作することを実験によって確認し，アクエラスコンピューティングの実現に向けて実験を行った．メモリの逐次的なビットの書き換えを実現するために，一度ビットの書き換えに用いたオープナーを除去する必要がある．本研究で，オープナーと相補的な配列を加えることによってこのことが可能であることを示した(成果リスト[3][7]参照)．

## 【成果リスト】

- [1] 山本雅人，大内 東：「DNA コンピューティングと最適化」，平成 16 年電気学会全国大会講演論文集, to appear (2004)
- [2] Satoshi Kashiwamura, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: General Protocol for Evaluating the Degree of Occurrence of Mis-Hybridization, Proceedings of the Ninth International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB 9th '04), pp. 303-308 (2004)
- [3] Naoto Takahashi, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: Construction and Verification of DNA Hairpin-based RAM, Proceedings of the Ninth International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB 9th '04), pp. 388-391 (2004)
- [4] Masashi Nakatsugawa, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: Study of the Efficient Parameter Setting based on Mahalanobis-Taguchi Strategy, Proceedings of the International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC03), pp. 640-643 (2003)
- [5] Satoshi Kashiwamura, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: Two Step Search for DNA Sequence Design, Proceedings of the International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC03), pp. 1815-1818 (2003)
- [6] Keisuke Hashimoto, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: State Transition Model Based on DNA Polymerization, Proceedings of the International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC03), pp. 1889-1892 (2003)
- [7] Naoto Takahashi, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: Construction of DNA Hairpin based RAM, Proceedings of the International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC03), pp. 1897-1900 (2003)
- [8] Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: The Effect on a Bonding Strength by the Freedom of Movement of a DNA strand on a Solid Support in DNA Computing, Proceedings of the International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC03), pp. 1901-1904 (2003)
- [9] Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: Nearest-Neighbor Thermodynamics of DNA Sequences with Single Bulge Loop, Proceedings of 9th International Meetings on DNA Based Computers (DNA9), pp. 150-159 (2003)
- [10] Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto, Hiroki Uejima, Masami Hagiya, Kensaku Sakamoto and Azuma Ohuchi: Conformational Addressing using the Hairpin Structure of Single-strand DNA, Proceedings of 9th International Meetings on DNA Based Computers (DNA9), pp. 197-201 (2003)