

「パラメータ制御方式による分子計算」

研究代表者： 大内 東（北海道大学大学院情報科学研究科）

研究分担者： 山本 雅人（北海道大学大学院情報科学研究科）

川村 秀憲（北海道大学大学院情報科学研究科）

1．研究の目的

化学反応のもつ超並列性を利用した分子計算が注目を浴びるようになってから，解候補の並列的生成，及び，検査といったいわゆる Adleman-Lipton パラダイムや，形態変化や DNA タイルによる計算方式など数多くの分子計算手法が提案されてきた．これらに共通する問題として，計算誤差に関する議論がある．分子計算が生体分子を用いた化学反応に基づく計算手法である以上，計算誤差に関する議論は避けて通れない．ここでは，計算誤差を望まれない反応が起こることとして用いることとする．計算誤差には，反応温度や分子濃度といった実験操作に起因する外在的なものが存在するが，これらは実験プロトコルの最適化を行うことによって誤差の減少が期待できるものである．しかしながら，こういった実験プロトコルの詳細な分析や，反応時間と反応効率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．また，DNA 濃度などが計算の重要な役割を果たす計算モデルでは，DNA 濃度の定量性の議論も必要となってきた．このような定量性を含めた計算モデルでは，より信頼性の高い計算手法が重要となる．一方，計算誤差は，塩基配列設計の問題に起因する場合も多い．従って，高信頼性を有する分子計算手法を確立するためには，DNA 塩基配列へのコーディングの問題，及び，実験過程におけるプロトコルの問題，の両面からアプローチする必要がある．

以上のような背景から本研究では，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が重要であると考え．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いってよい．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，反応時間や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．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．その結果，反応を制御するための塩基配列設計手法の確立を目指す．

2．研究の項目と役割分担

目的達成のために，具体的に以下の項目について研究を行う．大内班では，主に化学実験に関する部分を山本が担当し，大内，川村は，塩基配列設計手法や実験プロトコルの最適化

理論，シミュレーションツールの開発について担当している．具体的な研究項目は時系列的に，以下の通りである．

- (1) 反応時間と反応効率の関係の分析
- (2) PCR 増幅における実験プロトコルの最適化
- (3) 状態遷移型 PCR の実現とシミュレーション
- (4) バルジループ構造を含む塩基配列の安定性測定
- (5) 2-Step Search 法による塩基配列設計手法の検討
- (6) 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
- (7) バルジループ構造をとる DNA の安定性に関するモデル化
- (8) 自由エネルギーに基づいた塩基配列設計アルゴリズムの提案
- (9) 自由エネルギーに基づいた塩基配列設計の有効性の検証
- (10) DNA タイルのための自由エネルギーを考慮した塩基配列設計アルゴリズムの提案
- (11) DNA リレーショナルデータベースの実現とデータ検索
- (12) 自由エネルギーに基づく DNA タイル設計支援システムの構築
- (13) 自由エネルギー・融解温度に基づくハイブリダイゼーションプロセスの解析

3．研究活動と班内の連携状況

大内班のメンバーは同じ研究室内に所属しているため，日頃から実験結果などについて議論を行いながら研究を遂行している．また，化学実験，理論的解析，そして，シミュレーションによる解析と多角的な立場で分子計算の信頼性向上に向けて研究を行っている．また，分子計算研究会への出席や北海道大学で開催された夏のセミナーなどで，他の班との交流を行う中で，研究遂行のための情報交換や議論を頻繁に行っている．また，夏のセミナーでは，他の班の研究者に対して，化学実験実習会を開催して，これまで化学実験を行っていない研究者に対する指導も行い，より議論が活発，かつ，充実させるための努力も行っている．

4．各項目について

【平成 14 年度の成果】

上記の項目毎に以下のような研究成果を得た．

(1) 反応時間と反応効率の関係の分析

カイネーション，ハイブリダイゼーション，ライゲーションといった化学反応は，Adleman-Lipton パラダイムにおいて重要な計算過程の一つである．本研究では，これらの反応時間短縮を目的として，カイネーション反応(リン酸修飾)，及び，ライゲーション反応(DNA 鎖の継ぎ目を結合させる反応)におけるカイネーション，ライゲーション反応時間と反応効率との関連を調べた．特に，ライゲーション反応が時間のかかる反応であることから，ライゲーション反応についての分析を中心に行った．具体的には，ライゲーション時間を 10 秒から 20 時間程度まで変化させ，ライゲーション反応が実際に起こっているかを経路生成の問題に

帰着させて測定した。その結果、ほぼ数秒でライゲーション反応の 90% 以上が終了しており、その後はゆっくりと反応が進んでいることが確認できた。また、ライゲース(酵素)の濃度による影響もかなりあることがわかった。この成果により、DNA 分子計算における計算(反応)時間を大幅に縮める可能性を確認できた。

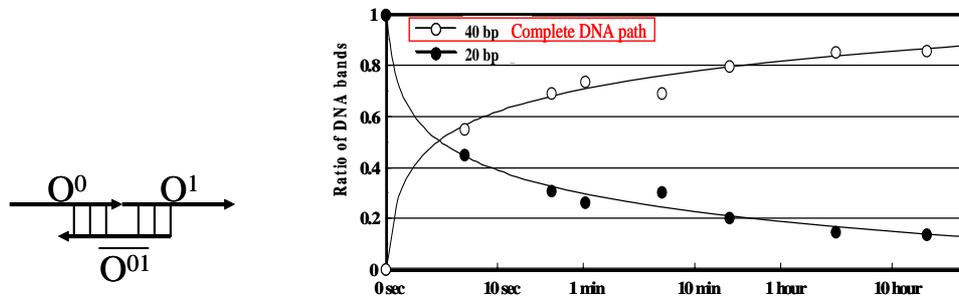


図1 ライゲーション反応の効率

(2) PCR 増幅における実験プロトコルの最適化

分子計算における実験操作の信頼性を向上させるような実験パラメータの調整方法の提案を行った。実験結果の再現性と増幅効率の尺度から構成される評価基準を信頼性と定義し、PCR による DNA の増幅過程に対して適用した場合の有効性について議論した。具体的には、長さ 80、及び、120 の塩基配列を持つ二種類の DNA を増幅するプロセスにおいて、増幅効率、及び、再現性を向上させるために品質工学的手法の適用を試み、実際に増幅効率向上、及び、再現性の向上を実験によって確認した。

(3) 状態遷移型 PCR の実現とシミュレーション

DNA の濃度を計算結果として用いる計算モデルを最短経路問題に適用した。この際、ハイブリダイゼーション反応では、数多くの解候補(有向グラフ上の経路)を生成し、実際に生成される経路の濃度は、反応前の各 DNA の濃度に影響を受ける。このハイブリダイゼーション反応過程における DNA 濃度の変化をシミュレータを作成することによって分析を行った。また、シミュレータにおけるパラメータ調整のための実験系を設計して、実際に実験を行った。ハイブリダイゼーションによる経路生成を行い、その経路長毎の分離結果から生成経路 DNA 結合体を定量可能とするためにシンプルな構造の有向グラフを利用した。実験結果からパラメータの調整を行い、シミュレーションモデルの有効性を検討した。

(4) バルジループ構造を含む塩基配列の安定性測定

バルジループ(数塩基を飛ばして二本鎖を形成する)を含む DNA 塩基配列が二本鎖形成へ与える影響について調査した。特に、一塩基のバルジループが DNA 二本鎖のどの位置にあるかによって、二本鎖形成に対してかなり大きな影響を及ぼすことが予備的な実験により明らかになった。そこで、どの塩基がどの位置でバルジループとなるのがどのように DNA の融解温度(TM)に影響を与えるかについて調べた。それらの結果より、長さ 20 塩基の DNA においては、真ん中に近い位置にバルジループがあるときに端の方にあるときより、融解温度が下

がる傾向にあることがわかった。これらの性質は、塩基配列の異なる DNA においても共通に見られる現象であり、バルジループの位置によってどれだけ融解温度が下がるかをモデル化できる可能性を確認した。従来は、位置による影響を考慮していなかっただけに、DNA コンピューティングにおける塩基配列設計問題に関して重要な知見を得ることができた。

【平成 15 年度の成果】

上記の項目毎に以下のような研究成果を得た。

(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った。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った。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。

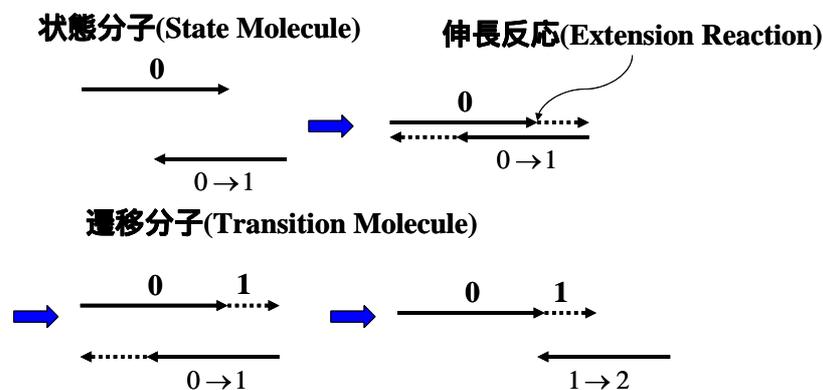


図 2 状態遷移PCR

(4) 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ど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。

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。

(5) 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。

(6) 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、アクエア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。

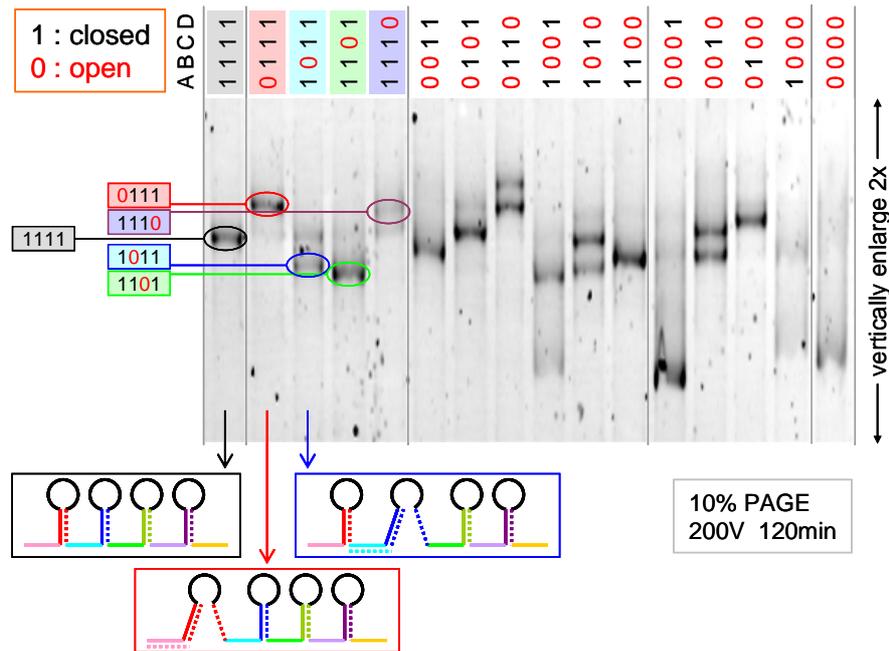


図3 4ビットヘアピン型メモリの動作確認

【平成16年度の成果】

(6) 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

平成15年度までに作成した4ビットのヘアピン型DNAメモリを用いて、アクエアスコンピューティングの実現を行うために、ヘアピン開裂の逐次的制御を可能とした。3回の逐次的開裂を行うことで8状態のメモリ状態を同じプール内に作成することができた。また、多くのメモリ状態が存在するプールにおいて、解となるビット状態を表すメモリ分子を取り出すための手法を提案し、アクエアスコンピューティングの実現可能性について検討した。さらに、ヘアピンを開くために必要なオープナー分子の長さについて検討を行い、8塩基以上のオープナー分子がメモリ分子にアニールすることでヘアピンが開裂可能であることを示した。さらに、その成果を受けて、このメモリを利用したアクエアスコンピューティングによって、NP完全問題の一つである最大独立集合問題への適用を試みた。線形回数の操作で指数関数的に増加する状態数を作りだせる。計算後のbit状態を実験的に検出するため、オープナーによって目的のヘアピンを開いた後にフィラー(閉じているヘアピンの両側のリード部に相補な一本鎖DNA)を加えて閉じたヘアピンの相補配列を補い、ライゲーション反応でオープナー、フィラー側のDNA鎖を連結することで、閉じているヘアピン(bit状態:1)の数を相補鎖長へと変換する手法を考案した。この手法によって、得られた相補鎖のうち最短のものを調べることで最大独立集合問題の最適解を検出することが可能となる。実現のために、オープナーの形状を変更したり、反応温度を調整する工夫を行ったりしたのち、実際に実験によって最適解が抽出できることを確認した。

(7) バルジループ構造をとるDNAの安定性に関するモデル化

複数種の一本鎖DNAが存在する場合、必ずしも相補的な配列のみが結合するわけではなく、

バルジループなどといった構造をとる場合があることが知られている。こういった構造をなるべく避けて、相補的な配列のみが特異的に反応するような塩基配列を得るために、DNA分子の自由エネルギーに基づいた分子の安定性予測を利用する方法が提案されている。従来の方法では自由エネルギーの予測にかかる時間が大きく、効率の良い探索ができなかった。本年度の研究で、このような塩基配列設計問題に対して、避けるべき構造を持つようなDNA分子の自由エネルギー計算を近似的に行い、有望なもののみについて自由エネルギーをより厳密に計算する。このフィルターとしての機能を組み込むことで、探索全体にかかる時間を大幅に改善する方法を提案しその有効性を計算機実験によって示した。

(8) 自由エネルギーに基づいた塩基配列設計アルゴリズムの提案

DNA コンピューティングの多くは、相補対な DNA の結合によって自律的に二本鎖を形成する性質を利用している。そのため、二本鎖を形成するハイブリダイゼーション反応の制御が信頼性向上の最も重要な要素の一つである。DNA の二本鎖の形成の様相は、塩基配列に強く依存するため、塩基配列設計が非常に重要となる。塩基配列設計では、DNA の塩基配列を適切に設計し、意図した結合のみが形成される必要がある。従来の塩基配列設計では、結合の安定性の指標として相補対の数（以下、 BP ）を用いていたが、これは粗い近似に過ぎないために、意図しない結合を防ぐことができないという問題があった。

本研究では、結合の安定性の指標として最小自由エネルギー（以下、 ΔG_{\min} ）を用いた塩基配列設計法を提案した。特に、自身の相補鎖とのみ結合するような塩基配列集合の設計問題に関してアルゴリズムの提案および評価を行った。 ΔG_{\min} の予測には計算コストがかかるため、限られた時間では多数の解候補を探索するには局所的な探索が適していると考えられている。このような背景から、提案するアルゴリズムは、ランダムに解候補を生成し、解候補が全ての制約条件を満たした場合にのみ解集合に加えるという手続きを繰り返すアルゴリズムである generate-and-test 法を採用した。その際、制約条件判定のために 3 つのフィルターを用いて探索を行う。 T_m フィルターと ΔG_{\min} フィルターは、それぞれ T_m と ΔG_{\min} に関する制約の判定を行うために用いられる。実際には、 ΔG_{\min} の予測の計算コストを軽減するため、 ΔG_{\min} の粗い近似であり計算コストのかからない ΔG_{gre} という尺度を提案し、 ΔG_{gre} の値に基づき、制約を満たさない配列を除くことのできる ΔG_{gre} フィルターを提案した（図 4）。 ΔG_{\min} フィルターで除くべき候補の塩基配列を ΔG_{gre} フィルターで前もって除くことが可能となるため、 ΔG_{\min} 計算を省略することができ、全体の計算時間の削減が確認できた。

(9) 自由エネルギーに基づいた塩基配列設計の有効性の検証

(8)の研究で述べたように、従来の塩基配列手法の多くは、相補対の数 BP を主な指標として用いていた。(8)では、最小自由エネルギー ΔG_{\min} に基づく塩基配列手法を提案した。本研究では、この最小自由エネルギーに基づく塩基配列設計がこれまでの BP での設計手法と比較して、計算の信頼性の立場から、本当に有効であるかどうかを化学実験によって検証した。

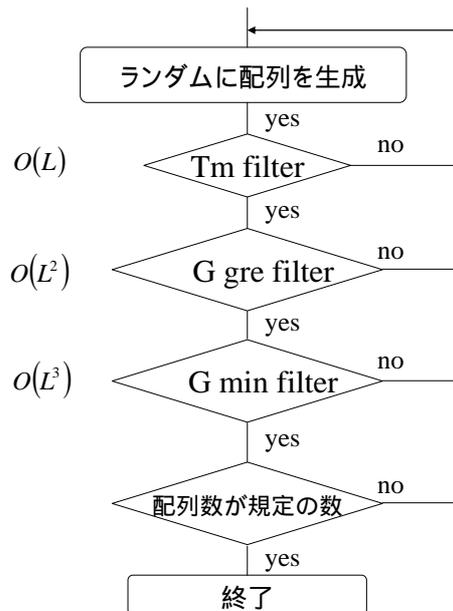


図4 自由エネルギーを考慮した塩基配列設計アルゴリズムの概要

具体的には, BP による評価が同じであるが, 最小自由エネルギーの異なる複数の一本鎖塩基配列対を用意し, 一般的な条件下でハイブリダイゼーション反応を行い, 二本鎖の形成が行われているかを電気泳動によって確認した. 二本鎖が形成された場合は, ゲル内の移動度が減少し, 一本鎖の場合に比べて, 異なるバンドとして検出できる.

実験の結果から, BP に比べて最小自由エネルギーによる評価の方が適切であること, また, ハイブリダイゼーションにより二本鎖を形成するためには, 計算される最小自由エネルギーの絶対値がある閾値以下とならなくてはならないことがわかった. これらの知見は, (8)での塩基配列設計手法と組み合わせることで, ミスハイブリダイゼーションを起こさない塩基配列の設計が可能となると考える.

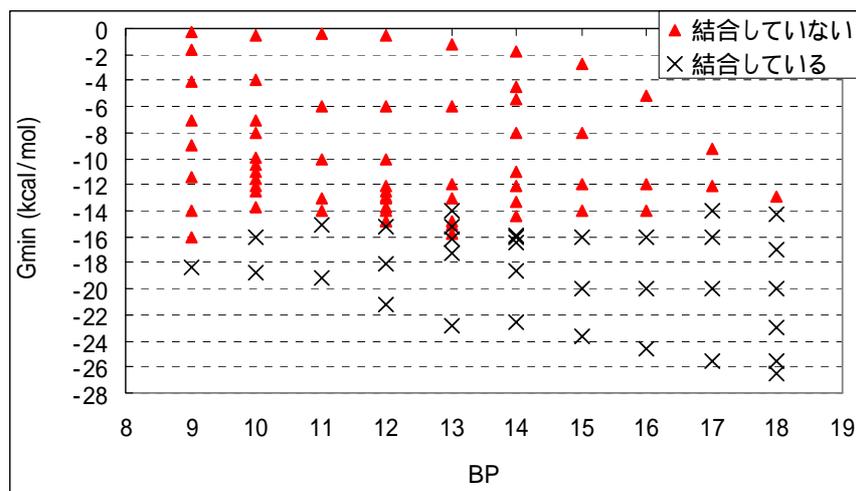


図5 BPと ΔG_{\min} の値と二本鎖形成との関係(ΔG_{\min} がほぼ-15付近より低い場合は, 二本鎖への結合反応が観測された. 一方, BPの値と結合の間には弱い相関しか見られない.)

【平成 17 年度の成果】

(10) DNA タイルのための自由エネルギーを考慮した塩基配列設計アルゴリズムの提案

複数の一本鎖 DNA を巧みに交叉させながら相補結合させることで、平面的なタイル構造を作ることができる。このようなタイル構造を DNA タイルと呼ぶ。一般に、各 DNA タイルは複数の粘着末端(一本鎖 DNA)を持っており、他のタイルの相補的な粘着末端と特異的に結合することで、より大きな構造を形成することが可能である。粘着末端部を適切に変えて(プログラムして)DNA タイルを自己組織的に反応させることで、さまざまな構造やタイルパターンの生成を制御する試みが行われている。しかしながら、DNA タイルによってタイルパターンの生成を制御するためには、DNA タイルの構成要素となる複数の一本鎖 DNA の塩基配列を適切に設計する必要がある。しかしながら、現状では、複数の一本鎖 DNA を用いて複雑なタイル構造を生成するための塩基配列設計手法はほとんど確立されていないといっている。ほとんどの DNA タイルは、Seeman による配列設計手法を採用しているが、これは各一本鎖 DNA に含まれるある長さ以上の部分塩基配列が他の一本鎖 DNA の部分配列として現れないような塩基配列を探すインタラクティブなプログラムである。この手法は、シンプルで分かりやすいが一本鎖 DNA 間の結合性を単なる部分配列の相補性のみで近似しているのみで、安定性の判定基準としては不十分である。

本研究では、一本鎖 DNA 間の結合性の尺度として自由エネルギーを用いて、DNA タイルの構成要素となる複数の一本鎖 DNA 間の結合安定度を予測し、望みの相補結合はより安定に、望まない相補結合はより不安定になるような塩基配列の設計手法の開発を行った。提案した手法を Yan らによって提案された 4×4 タイルに適用して、Yan らの設計した DNA タイルとの安定性について議論した。提案した評価尺度が実際に安定性の尺度として適切であるかの化学実験的検証が必要ではあるが、従来の塩基配列設計手法と比較して、容易により安定な DNA タイルを設計できる可能性があることを示した。

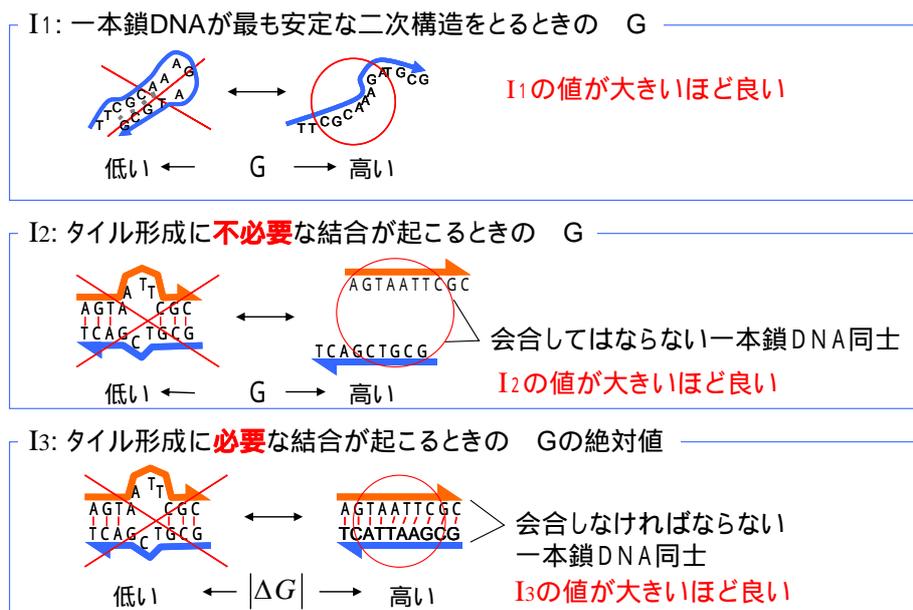


図 6 DNA タイルの安定性評価のための評価項目

(11) DNA リレーショナルデータベースの実現とデータ検索

DNA計算を利用した応用については様々なものがある．DNAタイルを用いた計算やナノテクノロジーへの応用と並んで，DNAをメモリとして利用しようという試みもなされている．その中で，ゲノム情報などのウェットな情報をDNAの形としてそのまま保存できるようなデータベースの構築を目指す研究も行われている．DNAの形で保存して，必要な際には，データ検索を実行してそのままウェットな実験を行うことも可能であり，また，容易にコピーができないことやデータの読み取りが容易でないことからセキュリティの高いデータベースとして注目されている．本研究では，DNAを用いたリレーショナルデータベース実現とデータの内容に基づいた検索操作の実行について検証を行った．

データベースの各データ要素に対して，一種類の一本鎖DNAを対応させるモデルを提案し，基本となる5種類の関係演算の実行が可能であることを実験的に示した．また，データの内容に基づくクエリの実現方法を提案し，実際に3つのタプル(レコード)から検索条件にマッチする一つのタプルを取り出す実験に成功した．

また，任意のクエリを実験操作列に変換するアルゴリズムを提案し，その出力結果をもとに計算時間の見積もりやエラーの見積もりを行う方法を提案した．

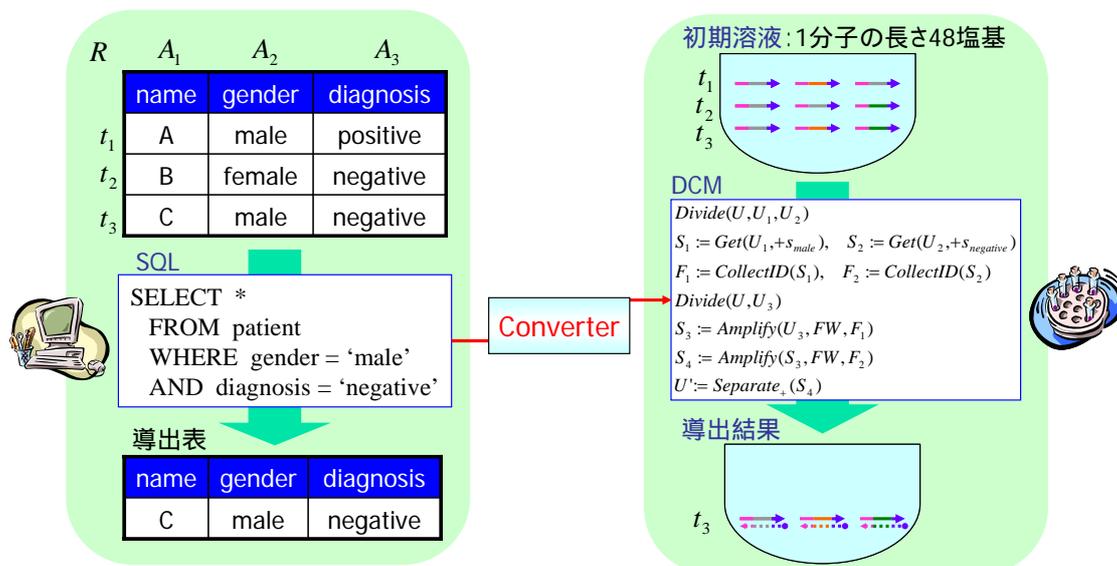


図7 DNA リレーショナルデータベースにおけるクエリの実現

【平成 18 年度の成果】

(12) 自由エネルギーに基づく DNA タイル設計支援システムの構築

平成 17 年度の研究成果を受けて，DNA タイル設計のための塩基配列設計支援システムの構築を行った．DNA タイルは，ナノ構造の形成やタイル計算に用いることが可能であることから近年注目を浴びている．しかしながら，DNA タイルは何本もの一本鎖 DNA の結合体であることからその構造安定性を求めることは困難であり，これまで，ヒューリスティックな方法として，重複する連続した部分塩基配列を避ける方法が使用されてきていた．

本研究では，DNA タイルの構造安定性を見積もる方法として，自由エネルギーを用いるこ

とにした。2本の一本鎖 DNA からできる主な結合体の自由エネルギーを見積もる方法は、これまでの研究で洗練されたものとなっている。このため、DNA タイルの構造体を 2本の一本鎖 DNA からなる部分に分けて、DNA タイルが望み通りに生成されたときの結合体の自由エネルギーが最も安定となるような尺度を設計することを目的としている。本研究では、設計支援のためのツールを開発した。DNA タイル設計の際には、各部分配列同士の非特異的結合を避けたり、融解温度や GC 含量などを考慮したり必要があり、それらを見積もるツールが必要である。また、作成した配列の解析や、山登り法による最適化手法による配列の自動生成も可能である。

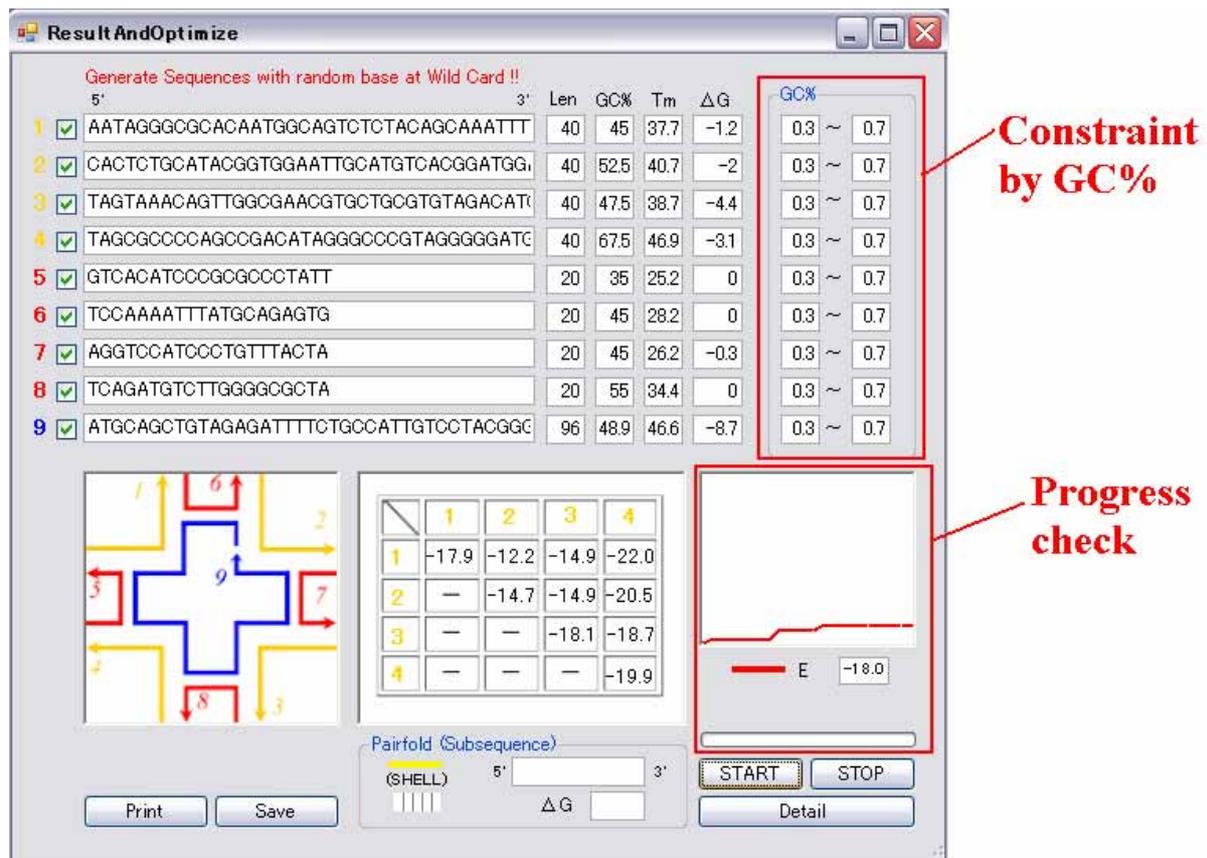


図8 DNA タイルの塩基配列設計支援システムの画面サンプル

(13) 自由エネルギー・融解温度に基づくハイブリダイゼーションプロセスの解析

ある一本鎖 DNA 配列が存在している反応系において、その配列と完全相補の配列を反応させると相補的な一本鎖 DNA が結合し、二本鎖 DNA となる。しかしながら、一方が一方の完全な相補配列でない場合でも二本鎖の結合、つまり、ミスハイブリダイゼーションが起こることが知られている。しかしながら、どのような場合にミスハイブリダイゼーションが起こるのかといった解析はこれまであまり研究されてこなかった。本研究では、ある一本鎖 DNA とその完全相補配列、及び、競合する塩基配列を混合した溶液中で起こるハイブリダイゼーションの特徴を自由エネルギーや融解温度の立場から明らかにした。

ある塩基配列 A と完全相補な塩基配列 B、及び、A と部分的に相補な配列を含む塩基配列 C が競合する反応系において、A と B の結合体の最小自由エネルギー、および、融解温度、また、A と C の結合体の最小自由エネルギー、および、融解温度との関係から、A と C が結

合してしまうミスハイブリダイゼーションの発生割合の分析を行った。検出には DNA に修飾した蛍光のクエンチングを利用した。結果的に、最小自由エネルギー、および、融解温度の差がミスハイブリダイゼーションに与える影響について、実験結果からモデル式を導出することに成功した。

【研究発表等】

[平成 14 年度]

Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
The Effect of the Bulge Loop upon the Hybridization Process in DNA Computing, The 5th International Conference on Evolvable Systems: From Biology to Hardware (ICES2003), Lecture Notes in Computer Science, Vol. 2606, pp. 446-456 (2003)

Masashi Nakatsugawa, Satoshi Kashiwamura, Masahito Yamamoto, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Towards a High Reliability of the PCR Amplification Process in DNA Computing, International Journal of Computational Intelligence and Applications, Vol. 2, No. 4, pp. 423-432 (2002)

Masahito Yamamoto, Atsushi Kameda, Nobuo Matsuura, Toshikazu Shiba, Yumi Kawazoe and Azuma Ohuchi:
Local Search by Concentration Controlled DNA Computing, International Journal of Computational Intelligence and Applications, Vol. 2, No. 4, pp. 447-455 (2002)

Yumi Kawazoe, Toshikazu Shiba, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
A Security System for Personal Genome Information at DNA level, Proceedings of IEEE Computer Society Bioinformatics Conference, pp. 314-320 (2002)

Atsushi Kameda, Nobuo Matsuura, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
An Analysis of Computational Efficiency of DNA Computing, Unconventional Models of Computation, Lecture Notes in Computer Science, Vol. 2509, pp. 191-198 (2002)

Masahito Yamamoto, Atsushi Kameda, Nobuo Matsuura, Toshikazu Shiba, Yumi Kawazoe and Azuma Ohuchi:
A Separation Method for DNA Computing Based on Concentration Control, New Generation Computing, Vol. 20, pp. 251-261 (2002)

Satoshi Kashiwamura, Masashi Nakatsugawa, Masahito Yamamoto, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Towards Optimization of PCR Protocol in DNA Computing, DNA Computing (DNA7), Lecture Notes in Computer Science, Vol. 2340, pp. 14-22 (2002)

Fumiaki Tanaka, Masashi Nakatsugawa, Masahito Yamamoto, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Developing Support System for Sequence Design in DNA Computing, The 7th International Meeting on DNA Computing, Lecture Notes in Computer Science, Vol. 2340, pp. 129-137 (2002)

Masahito Yamamoto, Nobuo Matsuura, Toshikazu Shiba, Yumi Kawazoe and Azuma Ohuchi:
Solutions of Shortest Path Problems by Concentration Control, DNA Computing (DNA7), Lecture Notes in Computer Science, Vol. 2340, pp. 203-212 (2002)

Fumiaki Tanaka, Masashi Nakatsugawa, Masahito Yamamoto, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Towards a General-Purpose Sequence Design System in DNA Computing, Proceedings of 2002 Congress on Evolutionary Computation(CEC2002), pp. 73-78 (2002)

Masahito Yamamoto, Atsushi Kameda, Nobuo Matsuura, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Simulation Analysis of Hybridization Process for DNA Computing with Concentration Control,
Proceedings of 2002 Congress on Evolutionary Computation(CEC2002), pp. 85-90 (2002)

Masashi Nakatsugawa, Masahito Yamamoto, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Design of a PCR Protocol for Improving Reliability of PCR in DNA Computing, Proceedings of 2002
Congress on Evolutionary Computation(CEC2002), pp. 91-96 (2002)

Masashi Nakatsugawa, Masahito Yamamoto, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Improvement of the Reliability of Experiments in DNA Computing, Preliminary Proceedings of 8th
International Meeting on DNA Based on Computings(DNA8), pp. 333-333 (2002)

Yumi Kawazoe, Toshikazu Shiba, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
Constructions of Security System for Information Encoded by DNA, Proceedings of 8th International
Meeting on DNA Based on Computings(DNA8), pp. 337-337 (2002)

Satoshi Kashiwamura, Masahito Yamamoto, Atsushi Kameda, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Hierarchical DNA Memory based on Nested PCR, Proceedings of 8th International Meeting on DNA
Based Computers, pp. 231-240 (2002)

山本 雅人, 柴 肇一, 大内 東:
解説 DNA コンピューティングパラダイム-その原理と工学応用への課題, システム/制御/情
報, Vol. 5 (2002)

[平成 15 年度]

Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
Nearest-Neighbor Thermodynamics of DNA Sequences with Single Bulge Loop, The 9th International
Meeting on DNA Computing, Lecture Notes in Computer Science, Vol. 2943, pp. 170-179 (2004)
S

atoshi Kashiwamura, Masahito Yamamoto, Atsushi Kameda, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Hierarchical DNA Memory Based on Nested PCR, DNA Computing (DNA8), Lecture Notes in
Computer Science, Vol. 2568, pp. 112-123 (2003)

Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto, Hiroki Uejima, Masami Hagiya, Kensaku Sakamoto and
Azuma Ohuchi:
Conformational Addressing Using the Hairpin Structure of Single-Strand DNA, 9th International
Workshop on DNA Based Computers (DNA9), Vol. 2943 of LN, pp. 219-224 (2004)

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), Vol. 1, pp. 303-308
(2004)

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), Vol. 2, pp. 388-391 (2004)

Masashi Nakatsugawa, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
Study of the Efficient Parameter Setting based on Mahalanobis-Taguchi Strategy, Proceedings of the
2003 International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications
(ITC-CSCC 2003) (2003)

Satoshi Kashiwamura, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
Two-Step Search for DNA Sequence Design, Proceedings of the 2003 International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC 2003), (2003)

Keisuke Hashimoto, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
State Transition Model Based on DNA Polymerization, Proceedings of the 2003 International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC 2003) (2003)

Naoto Takahashi, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
Construction of DNA Hairpin-based RAM, Proceedings of the 2003 International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC 2003) (2003)

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 2003 International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC 2003) (2003)

Satoshi Kashiwamura, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
Evaluation and Benchmarking, Proceedings of Workshop on Simulation Tools for Biomolecular Computing in 2003 Congress on Evolutionary Computation (CEC2003), pp. 22-26 (2003)

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, Vol. 4-S19, pp. 13-16 (2004)

高橋 直人, 亀田 充史, 山本 雅人, 大内 東:
ヘアピン構造 DNA を利用した RAM の構築, 情報処理北海道シンポジウム 2003 講演論文集, pp. 85-86 (2003)

大内 東, 山本 雅人, 川村 秀憲, 柴 肇一, 高柳 俊明, 當間 愛晃, 遠藤 聡志:
相互作用科学シリーズ 生命複雑系からの計算パラダイム, 森北出版株式会社 (2003)

萩谷 昌己, 山本 雅人, 亀田 充史:
分子プログラミング 大容量分子メモリと分子, 臨時別冊・数理科学 SGC ライブラリ-31 分子コンピュータの現状と展望 - 分子プログラミングへの展開 -, pp. 112-118 (2004)

[平成 16 年度]

Satoshi Kashiwamura, Masahito Yamamoto, Atsushi Kameda, Toshikazu Shiba and Azuma Ohuchi:
Potential for enlarging DNA memory: the validity of experimental operations of scaled-up nested primer molecular memory, Biosystems, Vol. 80, No. 1, pp. 99-112 (2005)

Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
Design of nucleic acid sequences for DNA computing based on a thermodynamic approach, Nucleic Acids Research, Vol. 33, No. 3, pp. 903-911 (2005)

Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:
Thermodynamic Parameters Based on a Nearest-Neighbor Model for DNA Sequences with a Single-Bulge Loop, Biochemistry, Vol. 43, No. 22, pp. 7143-7150 (2004)

Satoshi Kashiwamura, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:

Two-Step Search for DNA Sequence Design, IEICE TRANSACTIONS on Fundamentals of Electronics, Communications and Computer Sciences, Vol. E87-A, No. 6, pp. 1446-1453 (2004)

Derrel Blain, Max Garzon, Soo-Yong Shin, Byoung-Tak Zhang, Satoshi Kashiwamura, Masahito Yamamoto, Atsushi Kameda and Azuma Ohuchi:

Development, Evaluation and Benchmarking of Simulation Software for Biomolecule-based Computing, Natural Computing, Vol. 3, No. 4, pp. 427-442 (2004)

Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto, Hiroki Uejima, Masami Hagiya, Kensaku Sakamoto and Azuma Ohuchi:

Conformational Addressing Using the Hairpin Structure of Single-Strand DNA, DNA Computers (DNA9), Lecture Notes in Computer Science, Vol. 2943, pp. 219-224 (2004)

Yutaka Kita, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:

Design of Soccer-ball-shape DNA Molecules and Preliminary Experiments in Vitro, Proceedings of The 10th International Symposium on Artificial Life and Robotics (2005)

Naoto Takahashi, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:

Aqueous Computing with DNA hairpin-based RAM, Preliminary Proceedings of the Tenth International Meeting on DNA Based Computers (DNA10), pp. 50-59 (2004)

Atsushi Kameda, Keisuke Hashimoto, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:

Probabilistic State Transition Model based on PCR, Preliminary Proceedings of the Tenth International Meeting on DNA Based Computers (DNA10), pp. 448-448 (2004)

北 豊, 亀田 充史, 山本 雅人, 大内 東:

サッカーボール型 DNA 分子の設計と基礎実験, 情報処理北海道シンポジウム 2004 講演論文集, pp. 14-15 (2004)

高橋 直人, 亀田 充史, 山本 雅人, 大内 東:

DNAヘアピンを利用したRAMによるアクエラスコンピューティング, 情報処理北海道シンポジウム 2004 講演論文集, pp. 16-17 (2004)

[平成 17 年度]

Naoto Takahashi, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:

Aqueous Computing with DNA Hairpin-Based RAM, DNA Computers (DNA10), Lecture Notes in Computer Science, Vol. 3384, pp. 355-364 (2005)

Naoki Iimura, Masahito Yamamoto, Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda and Azuma Ohuchi:

Stability evaluation method of DNA tile structure, The Eleventh International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB11th) (2006)

Yutaka Kita, Satoshi Kashiwamura, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:

Data Manipulation of DNA Relational Database, The Eleventh International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB 11th '06) (2006)

Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:

Specificity of Hybridization between DNA Sequences Based on Free Energy, Proceedings of The 11th International Meeting on DNA Computing, pp. 366-375 (2005)

Satoshi Kashiwamura, Masahito Yamamoto, Atsushi Kameda and Azuma Ohuchi:

Experimental Challenge of Scaled-up Hierarchical DNA Memory, Proceedings of The 11th International Meeting on DNA Computing, pp. 396 (2005)

山本 雅人:

DNA タイルによる自己組織的ナノ構造制御, 第 4 回情報科学技術フォーラム (FIT2005), イベント企画チュートリアル「分子計算の仕組み」, pp. 7-11 (2005)

飯村 直記, 山本 雅人, 田中 文昭, 亀田 充史, 大内 東:

自由エネルギーを用いた DNA ナノ構造形成のための塩基配列設計, 第 4 回情報科学技術フォーラム (FIT2005), pp. 371-373 (2005)

田中 文昭, 亀田 充史, 山本 雅人, 大内 東:

自由エネルギーに基づいた塩基配列設計に関する研究, 第 4 回情報科学技術フォーラム (FIT2005), pp. 375-377 (2005)

柏村 聡, 山本 雅人, 亀田 充史, 大内 東:

DNA を記憶素子として用いた分子メモリの開発と大容量化に関する検討, 第 4 回情報科学技術フォーラム (FIT2005), pp. 367-369 (2005)

北 豊, 柏村 聡, 亀田 充史, 山本 雅人, 大内 東:

DNA 分子を利用したリレーショナルデータベースの開発, 第 4 回情報科学技術フォーラム (FIT2005), pp. 21-23 (2005)

飯村 直記, 山本 雅人, 田中 文昭, 亀田 充史, 大内 東:

DNA タイル構造の安定性評価法, 北海道情報処理シンポジウム, pp. 126-127 (2005)

山本 雅人, 飯村 直記, 田中 文昭, 亀田 充史, 大内 東:

DNA タイルによる計算論的ナノテクノロジー, 第 28 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「ナノバイオテクノロジー・分析から構築の科学へ」, pp. 40-40 (2005)

[平成 18 年度]

雑誌論文 (国際)

Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto, Azuma Ohuchi, Satsuki Yaegashi and Masami Hagiya:
Unravel four hairpins!, Natural Computing online publishing (2007)

Masahito Yamamoto, Yutaka Kita, Satoshi Kashiwamura, Atsushi Kameda and Azuma Ohuchi:

Development of DNA Relational Database and Data Manipulation Experiments, DNA Computing (DNA12), Lecture Notes in Computer Science, Vol. 4287, pp. 418-427 (2006)

Naoki Iimura, Masahito Yamamoto, Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda and Azuma Ohuchi:

Sequence Design for Stable DNA Tiles, DNA Computing (DNA12), Lecture Notes in Computer Science, Vol. 4287, pp. 418-427 (2006)

Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi:

Specificity of Hybridization between DNA Sequences Based on Free Energy, The 11th International Meeting on DNA Computing, Lecture Notes in Computer Science, Vol. 3892, pp. 371-379 (2006)

Naoki Iimura, Masahito Yamamoto, Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda and Azuma Ohuchi:

Sequence Design for Stable DNA tiles, Proceedings of The 12th International Meeting on DNA computing., pp. 262-272 (2006)

飯村 直記, 山本 雅人, 田中 文昭, 大内 東:
DNA タイル構造のための塩基配列設計支援システムの構築, 北海道情報処理シンポジウム
2006 (2006)

飯村 直記, 山本 雅人, 田中 文昭, 大内 東, :
DNA を用いたタイル構造における接着結合部の塩基配列設計, 第 5 回情報科学技術フォー
ム (FIT2006) (2006)

5 . 今後の課題

本研究では, DNA を用いた分子計算の信頼性を向上するために, 反応を制御するための各種パラメータの設計手法と塩基配列設計手法の提案を行った. 特に, 自由エネルギーや融解温度を測定, もしくは, 予測することで, 計算誤差やミスにつながるミスハイブリダイゼーションについての予測や回避するための塩基配列設計手法の指針を得ることができた. 今後は, より多くの実験データを得ることにより, 上記のモデルの改良を行うなどの方向が考えられる.

また, ナノ構造の形成や計算に用いられる DNA タイルについて, より安定な DNA タイル構造を実現するための塩基配列設計手法の確立に向けて, タイルの安定性を予測するための評価関数の改良が挙げられる. 本研究で開発した塩基配列設計支援ツールの配布と改良を通して DNA タイル研究の推進につなげていくことも今後の課題の一つである.

6 . 研究費の使用状況

DNA を扱う実験装置を購入させて頂き, 既存の実験装置と併せて, DNA コンピューティングで用いる多くの実験が可能であった. また, 試薬や合成 DNA などの作成に多くの消耗品費を使用している. また, データ解析用, および, 塩基配列設計用の計算機サーバ, および, パーソナルコンピュータ, プレゼンテーション用のノートパソコンの購入などを行った. 他の班との意見交換や情報収集を行うための国内旅費, 及び, 海外での成果発表や情報収集のための国外旅費として使用した.