

「情報社会を支える新しい高性能情報処理技術」
平成13年度採択研究代表者

萩谷 昌己

(東京大学大学院情報理工学系研究科 教授)

「多相的分子インタラクションに基づく大容量メモリの構築」

1. 研究実施の概要

本課題では、複数種類のインタラクションを組み合わせた多相的分子インタラクションによる新しい分子コンピューティングの可能性を探究するとともに、その具体的な応用として、分子メモリの実現方法、特に別々のアドレスを持ったメモリ分子を個別に参照するための「分子アドレッシング」の技術の開発を行っている。

プロジェクト全体に関しては、7月9日のヒアリングにおいて指摘された問題点に対する検討を進め、検討結果に従ってプロジェクト全体の方向性を調整した。分子アドレッシングの応用を、バイオメトリクス的一种であるDNA認証(DNAインキ)およびDNAインキや遺伝子の微量分析のためのプログラム可能なマイクロリアクタに絞って、研究開発を進めることとした。

階層的分子アドレッシングのうちNPMM(Nested Primer Molecular Memory)に関しては、大内グループが27種類の配列を用いて12,166アドレスに相当するNPMMをシミュレートする実験を行い、ターゲットとなるメモリ分子のみの増幅に成功した。また、1億超アドレスを持つNPMM作成に向けて塩基配列の設計手法を検討した。その手法を用いて設計した配列によって5階層40配列程度のNPMMを構築可能と考えられる。

階層的分子アドレッシングのうちconformational addressingは萩谷グループと大内グループが共同で進めている。ヘアピン構造をとる一本鎖DNA塩基配列を2つ連続的に結合した分子に対して実験を行い、アドレッシングが適切に実行されていることを確認した。また、この実装結果に加えて入力の種類に従って状態が分岐する分子機械の実験結果を反映して、DNA分子の形態が作るエネルギー地形と形態変化の経路を解析するアルゴリズムを新たに開発することにより、配列の設計方法を洗練した。また、4連続のヘアピンを形成するための合成方法の検討を行うとともに、実際にDNAインキを実装することを目標に40本の配列セットの設計を試みた。

萩谷グループでは、以上に加えて、ジアゾベンゼンが挿入され光によって形態変化を起こすDNA分子の合成を東大先端研浅沼研究室に依頼し、合成されたDNAに対して予備実験を行った。また、WPCR(whiplash PCR)を用いた分子メモリの最終的な評価を行った。

固相上の分子アドレッシングは、陶山グループと岩崎・谷田グループが進めている。陶山

グループは、ヘアピンDNA分子の両末端に導入したTAMURAとDabcylによるFRETを利用して、ヘアピンDNA分子の融解曲線などを様々な条件の下で測定し、書き込みと消去の最適温度、書き込みと消去の際の温度変化速度の最適条件を決定した。その条件の下でヘアピンDNA分子メモリへの読み書き消去の操作を行い、連続的に50回の書き込みと消去を繰り返しても安定して動作することが確認された。また、ガラス基板の上にヘアピンDNA分子と赤外線吸収色素をより均一に塗布して固定する方法の検討を行なった。

岩崎・谷田グループでは、アモルファスDNA分子メモリ上での光を利用したデータ転送をめざし、光マニピュレーションを利用したDNAの位置制御やレーザー照射によるDNAの空間局所的反応技術に関する実験を行った。まず、データDNA分子を結合したビーズを光ピンセットにより輸送し、その後、別の波長のレーザーを照射して溶液の温度変化によりビーズからDNAを解放する一連の操作を実行できることを示した。さらに、開放されたDNAが溶液中に拡散することを防ぐため、基板上に作製したマイクロウェルアレイを利用する方法について検討し、マイクロウェル内の温度を上昇させてDNAを解放できることと、DNA結合ビーズをマイクロウェル間で輸送できることを確認した。

また、岩崎グループでは、光アモルファスDNA分子メモリを実現するための基礎技術として、DNAを固体表面に高密度で固定する技術を開発した。シリコン表面にSC1酸化膜を形成して、この上にOctadecyltrichlorosilane (OTS) の保護層を形成した上で、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて局所的に電流を流して新たにサブミクロンスケールの酸化膜を新たに作り、そこに今度は γ -aminopropyltriethoxysilaneを(γ -APTES)作用させてアミノ基を用意して、更にグルタルアルデヒドをリンカーとして用いることで、 λ DNAやアミノ基を導入したDNAを固定することが可能であることを検証した。

以上に加えて、陶山グループでは、昨年度までに設計した配列の正規直交性を評価する実験を行った。300個の正規直交配列の中からハイブリダイゼーション効率が大きく異なる6個の正規直交配列を選択し、それらのハイブリダイゼーション反応の速度を濃度や温度の条件を変えて調べた結果、配列によって速度が大きく異なることがわかった。正規直交配列のハイブリダイゼーション反応速度の配列依存性の原因を明らかにするとともに、より誤差の少ない解析方法により正規直交配列の増幅効率の一様性を評価する必要性を認識した。

横森グループでは、昨年度に引き続き理論研究を進めた。特に、無細胞タンパク質合成系による計算モデルの研究および分子計算シミュレータ LMNtal の設計と実装を進めた。

2. 研究実施内容

●萩谷グループ

○ヒアリングにおける問題点への対処とプロジェクト全体の方向性の調整

7月9日のヒアリングにおいて指摘された問題点は以下のようである。

1. アドレスの先に付けるペイロードは何か。
2. 具体的な応用に照らして開発する技術の評価すべきである。

3. 階層的分子アドレッシングと固相上分子アドレッシングの関係が弱い.
4. ナノテクに関しては競合技術が多く、提案テーマの優位性が明らかでない.

これらの問題点のうち、問題点1と問題点2に対しては、以下のようにアドレスの先に付けるペイロードを与えることにより、本プロジェクトの応用を明確にした.

○応用1: バイオメトリクス的一种であるDNA認証(DNAインキ)

ペイロード: DNA認証のための認証用データ

○応用2: DNAインキや遺伝子の微量分析のためのプログラム可能なマイクロリアクタ

ペイロード: マイクロリアクタのマイクロウェルに植え付ける機能分子

応用1は液相における階層的アドレッシングの直接的な応用であり、応用2は固相上分子アドレッシングの展開であるプログラム可能なマイクロリアクタをDNAインキや遺伝子の微量分析へ応用するものである.

DNAインキの実装方法としては、連結したヘアピン構造を逐次的にほどく反応(conformational addressing)の技術を用いて、(部分的に光制御なども利用して)より速くDNAインキを解析する技術の開発を行う. 具体的には、 $10 \times 10 \times 10 \times 10$ 本の配列(合計40本)を用意し、この中から10本の配列 $(x_0, y_0, z_0, w_0) \sim (x_9, y_9, z_9, w_9)$ を選ぶ. $(x_0, y_0, z_0, w_0) \sim (x_9, y_9, z_9, w_9)$ がインキ中あるかどうかは、10回の conformational addressingによって確認することができる.

問題点3に対しては、固相上分子アドレッシングにおいてよりきめ細かなアドレッシング制御を行うために、連想アドレッシングと組み合わせる方向性を示した. レーザを用いた固相上分子アドレッシングにおいては、マイクロメートル・スケールで平面上のアドレッシングを行うことができるが、異なる配列(アドレス)のヘアピン分子を固相上に固定しておけば、連想アドレッシングとレーザによる位置のアドレッシングを組み合わせる機能分子の植え付けを行うことができる. 例えば、

* アドレスAとアドレスBは100ナノメートル以内にある.

* アドレスAはアドレスBより密度が10倍高い.

などのように、アドレスに位置情報や密度情報などの付加価値を与えておけば、連想アドレッシングを活用して、よりきめ細かく機能分子の植え付けを行うことができる. ただし、アドレスに付加価値(特に位置情報)を持たせるには、サブミクロン・スケールでアドレス分子を固定する技術や、アドレスに従って規則正しく配置する技術が必要となる.

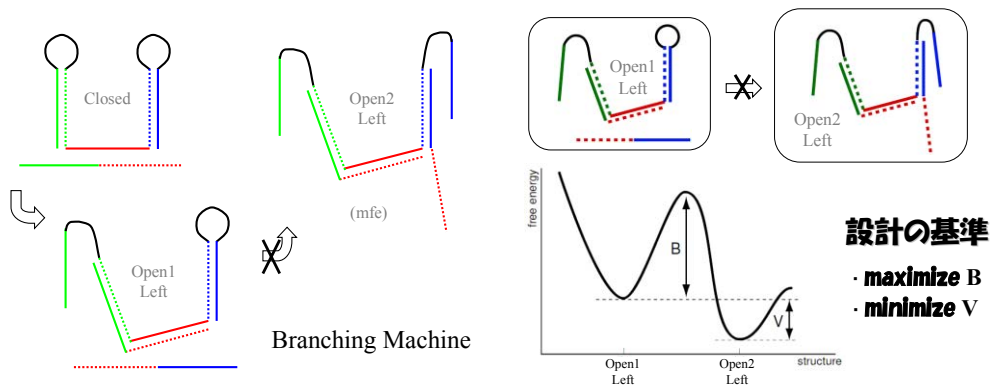
また、ヘアピン構造の利用を介して、階層的分子アドレッシングと固相上分子アドレッシングを組み合わせる可能性も指摘した. 階層的分子アドレッシングの conformational addressingではヘアピンの開閉と液中に存在するオリゴマー(さらに光によって制御された形態)によって、隣接するヘアピンの開閉が制御されているのに対して、固相上分子アドレッシングでは、局所的な温度変化と液中に存在するオリゴマーによってヘアピンの開閉が制御されている. 従って、階層的アドレッシングにおいても、光に加えて、温度変化をアドレッシングに利用することは可能であると考えられる. 逆に、固相上分子アドレッシングにおいても、ヘアピンの開閉に隣接するヘアピンの開閉を利用することは可能である. この

ように、ヘアピンの利用に関して、両方の技術を融合することは有意義であると考えた。

問題点4に対しては、上述したように、固相上分子アドレッシングにおいてよりきめ細かなアドレッシング制御を行うために、AFMなどの走査プローブ顕微鏡を用いた微細加工技術やDNA自己組織化の技術を利用する方向で、ナノテクに関連した研究を行うこととした。

○DNA分子の形態の作るエネルギー地形と変化経路の解析

エネルギー地形と変化経路の解析方法を開発する上で、解析の具体的な対象として、以下のように、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を取り上げた。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）。

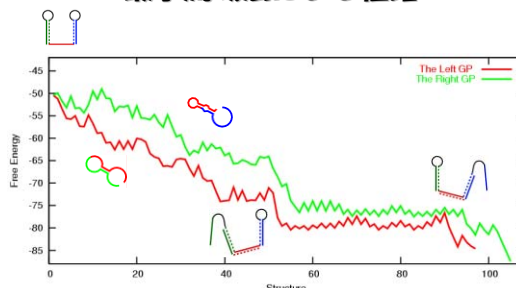
Minimum Basin Algorithm(最小流域アルゴリズム)

- 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）。

○Whiplash PCR

一本鎖DNA分子が、それぞれのコードするアドレス表（遷移テーブル）にしたがって、逐次的かつ自律的な形態変化を連続して起こす「WPCR(whiplash PCR)」を用いてアドレス参照を行う方法について検討した。

1) 分子メモリを大容量化するために不可欠な「アドレスの階層化」を行う上で、WPCRによる多段階の形態変化を利用した読みとりは、アドレス参照を階層の数に依存しない手間（反応溶液の調製 etc.）で行うことができる。昨年段階までに決定した反応条件から、さらに使用するDNAポリメラーゼや反応の温度スケジュールの最適化を行い、再現性よく高効率で反応を進行させることができるようになった。この結果についてリアルタイムPCR法による定量的な解析を行った結果、8段階の連続状態遷移では平均して各段階の遷移が70%以上の効率で進行することを明らかにした。この値は、1 pmol（ピコモル）程度の微量なDNAを用いて行う1回の連続状態遷移反応あたり、数十段階の演算ステップを一つの反応容器内で並列に実行できることを意味しており、今後の大容量化が期待される。

2) 分子メモリから特定のアドレスを持つ分子の情報だけを読み出し、その後の情報処理を可能にする手法として、適切な配列を持つ短鎖DNA分子を用いた分子間での相補鎖認識にもとづく入出力法について検討した。リアルタイムPCR法による定量的解析の結果からは、反応温度・時間やハイブリダイゼーション部位の長さを最適化することで反応効率の改善はみられたが、分子間でのハイブリダイゼーションは分子内でのヘアピン構造の形成と競合すると起こりにくいため、今後はリンカー分子の使用なども視野に入れて再検討することが必要であると考えられた。

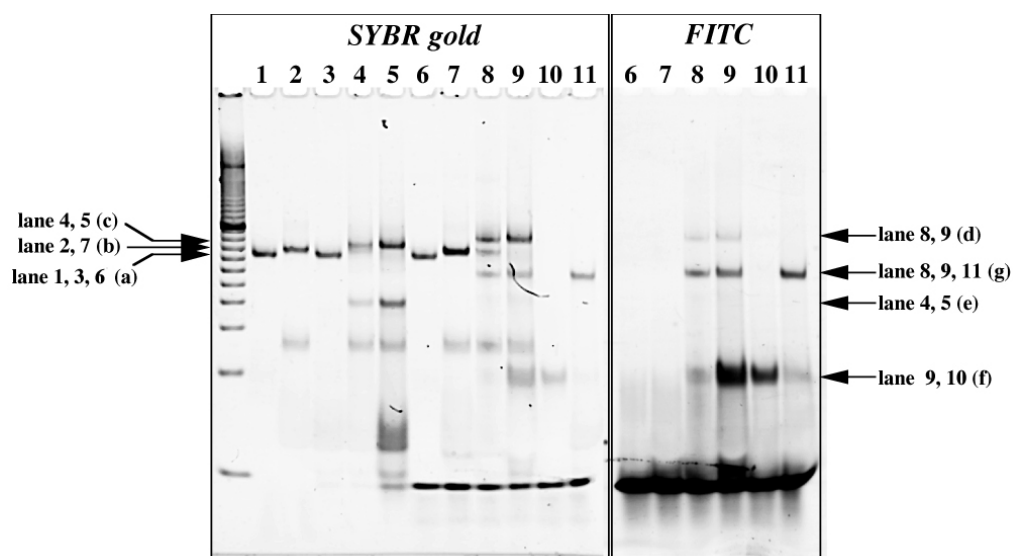
3) 異なる遷移テーブルをコードした、長さも異なる複数種のDNA分子が共存する条件下においても、それぞれの一本鎖DNA分子が独立した演算装置として連続状態遷移を正しく実行できることを確認した。この結果により、膨大な分子メモリ群のなかから、特定のア

Name	Sequence
Hairpin Template	5'-TACGAATATCGCTCCCAACCTAGCAAAAGCGGCCTCACTCT AACTATGAGTGAGGCCGCTTTTGCTACCAGTATATAACCAGCACCTGTTAGCC CCAGGTGCTGGTATATACTGG-3'
Input Oligomer A	5'-GAGTGAGGCCGCTTTTGCTAGGTTGGGAGCGATATTCGTA-3'
Input Oligomer B	5'-CAGGTGCTGGTATATACTGGTAGCAAAAGCGGCCTCACTC-3'
Probe ¹⁾	5'-CCAGTATATAACCAGCACCTG-3'

1) 5' end of the Probe was labeled by FITC.

Hairpinが二連続ヘアピン分子機械, Input Oligomer AとInput Oligomer Bは二つのヘアピンを開くオープナー, Probeは二番目のヘアピンが開いたことを確認するプローブである.

以下の図は, 以上の配列を用いて二個のヘアピン構造をほどく実験を行った結果である. 分子機械と二種類のオープナーを順に混合することにより, ヘアピンが逐次的に開いて構造が変化していることを電気泳動を用いて確認した.



各レーン, 以下のような順序で各種の分子を混合した結果である.

- Lane 1: Hairpin
- Lane 2: Hairpin + Input Oligomer A
- Lane 3: Hairpin + Input Oligomer B
- Lane 4: Hairpin + Input Oligomer A + Input Oligomer B
- Lane 5: Hairpin + Input Oligomer A + Input Oligomer B
- Lane 6: Hairpin + Probe

GA CTGGATAACTACTCCGTCAC TTACGGACGGAGTAGTTATCCAGTC -21.959999
TAATTTGCTCCCCCTACGTAGGACGGTTACGTAGGGGGAGCAAATTA -21.459999
CGTGACGTTATCCCAAGCTGTTGAAACCAGCTTGGGATAACGTCACG -24.030001
CAGGTTGAAAATCCGCTAACACGGAGGGTTAGCGGATTTTCAACCTG -22.290001
GGTTGTACCCTCAATGTGAGCTAATGCCTCACATTGAGGGTACAACC -22.219999
GTAATCGTTGCTAAGTCGTGAGCCCGCCACGACTTAGCAACGATTAC -22.059999
ATCTCTACGACGCAGA ACTCTCGTGAGGAGTTCTGCGTCGTAGAGAT -22.750000
AAACGGATCACTCCTCGCTCTTCATCTGAGCGAGGAGTGATCCGTTT -24.090000
TACCCAATGAATCTGCCACCAAGCCTAGGTGGCAGATTCATTGGGTA -22.860001
AAAAGTTACGCCATGACCCCGTCCATAGGGGTCATGGCGTAACTTTT -23.389999
GGTTAGCGATAATGTGGGCAACTATGGTGCCACATTATCGCTAACC -23.260000
ATTCAATCGGAGGTCCAGTGGTAGTGACACTGGACCTCCGATTGAAT -22.820000
CCGGTGTAACGAAGGTCATGCTAAAATCATGACCTTCGTTACACCGG -23.889999
GGTGGAGAGGGATTATGGCAATCTCAATGCCATAATCCCTCTCCACC -23.590000
ATCAGGGTAAATTGACGCTGGGCCACGCAGCGTCAATTTACCCTGAT -22.200001
GATAGTCCCTGCTTCATCACTTAGCCTGTGATGAAGCAGGGACTATC -22.330000
GGCATTACACGACAGTGGGGTAATTTTCCCCACTGTCGTGTAATGCC -25.129999
CCGACGTGGTTAATATGTCCGGCATAAGGACATATTAACCACGTCGG -22.900000
TATCTCCGACGATGCCGCATTCATTTGATGCGGCATCGTCGGAGATA -24.590000
CCTACTGTGGTCTCGCATGAAGCTTAATCATGCAGGACCACAGTAGG -23.850000
GGTTGCCGAAAGACCCGTAAGTATGAATTACGGGTCTTTTCGGCAACC -24.650000
GTGCATGGGT CAGTTGTAGTAAGGACA ACTACA ACTGACCCATGCAC -23.190001
GGA ACTTTTCGAGTCATGGAGGAAGGAGCTCCATGACTCGAAAGTTCC -22.770000
GTATGTAGATGGACCCTGAGCACATCACTCAGGGTCCATCTACATAC -21.750000
CGAGCCTGTTAACGCAGA ACTTGTGTTGTTCTGCGTTAACAGGCTCG -24.700001
CCGTTGTTGTAATGCTTCACGCCGAGAGTGAAGCATTACAACAACGG -22.770000
CAAAATCACAAGTGACGGGGAACGGGACCCCGTCACTTGTGATTTTG -23.469999
GGGTGAGAAATCCATAGGTAGCGCCGTTACCTATGGATTTCTCACCC -20.920000
GTTAGTAGCCCTCTCGAGACCTAAACTGTCTCGAGAGGGCTACTAAC -22.790001

selectivity (open): 0.297457 0.910869
selectivity (closed): 0.075250 0.822113
selectivity (closed): 0.050712 0.833916
selectivity (closed): 0.051630 0.814170
selectivity (closed): 0.067126 0.833105
selectivity (closed): 0.012789 0.821551
selectivity (closed): 0.038511 0.828093

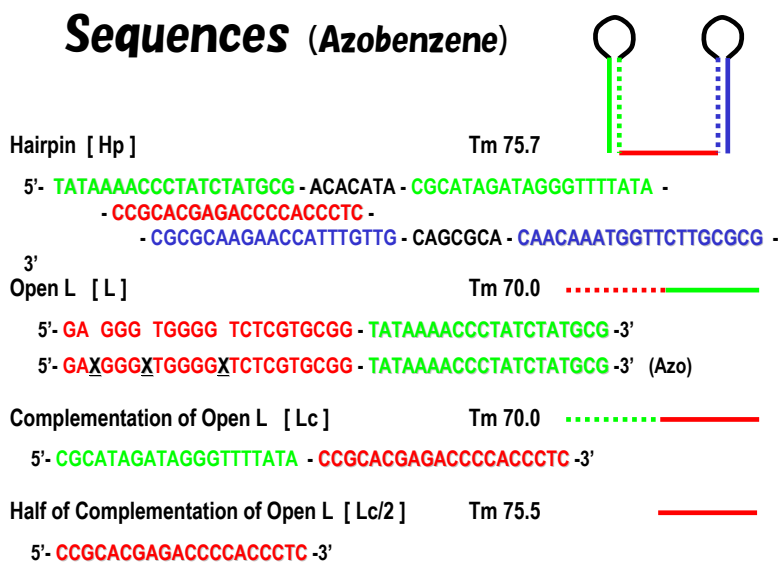
selectivity (closed): 0.057167 0.820325
selectivity (closed): 0.070055 0.857667
selectivity (closed): 0.057690 0.839767
selectivity (closed): 0.044719 0.799642
selectivity (closed): 0.006026 0.857053
selectivity (closed): 0.053624 0.850944
selectivity (closed): 0.039272 0.818989
selectivity (closed): 0.054085 0.831142
selectivity (closed): 0.042413 0.819822
selectivity (closed): 0.042384 0.809025
selectivity (closed): 0.050306 0.800792
selectivity (closed): 0.063167 0.850133
selectivity (closed): 0.041426 0.833384
selectivity (closed): 0.051292 0.815226
selectivity (closed): 0.045837 0.822542
selectivity (closed): 0.043614 0.823575
selectivity (closed): 0.063442 0.820429
selectivity (closed): 0.051032 0.846487
selectivity (closed): 0.059901 0.852240
selectivity (closed): 0.078695 0.838515
selectivity (closed): 0.052787 0.855026
selectivity (closed): 0.059939 0.855104
selectivity (closed): 0.033544 0.832717
selectivity (closed): 0.067083 0.829582
selectivity (closed): 0.040322 0.822598
selectivity (closed): 0.056913 0.822644
selectivity (closed): 0.002602 0.822425
selectivity (closed): 0.094941 0.836776
selectivity (closed): 0.012083 0.810964
selectivity (closed): 0.057975 0.834656
selectivity (closed): 0.060037 0.785738
selectivity (closed): 0.013780 0.838835
selectivity (closed): 0.044799 0.838961
selectivity (closed): 0.052560 0.814503
ordinality: 0.000020 0.957499
ordinality: 0.000527 0.956880
ordinality: 0.001787 0.958959

ordinality: 0.001614 0.957066
ordinality: 0.000497 0.959155
ordinality: 0.000425 0.949782
ordinality: 0.001074 0.949468
ordinality: 0.000765 0.955792
ordinality: 0.000400 0.957136
ordinality: 0.000439 0.953508
ordinality: 0.000869 0.947795
ordinality: 0.000418 0.957686
ordinality: 0.000802 0.953136
ordinality: 0.000402 0.954845
ordinality: 0.000277 0.958836
ordinality: 0.000751 0.950531
ordinality: 0.000469 0.942697
ordinality: 0.000331 0.959533
ordinality: 0.000393 0.955758
ordinality: 0.000344 0.947219
ordinality: 0.000380 0.941708
ordinality: 0.002679 0.955271
ordinality: 0.001153 0.946310
ordinality: 0.000370 0.953436
ordinality: 0.000971 0.953235
ordinality: 0.000436 0.952245
ordinality: 0.000681 0.951293
ordinality: 0.000486 0.952623
ordinality: 0.000477 0.953800
ordinality: 0.000713 0.951031
ordinality: 0.002054 0.953877
ordinality: 0.000686 0.955367
ordinality: 0.000616 0.953003
ordinality: 0.000777 0.945566
ordinality: 0.000342 0.939872
ordinality: 0.000620 0.954653
ordinality: 0.000416 0.945420
ordinality: 0.000470 0.946099
ordinality: 0.000672 0.959205
ordinality: 0.000252 0.944560

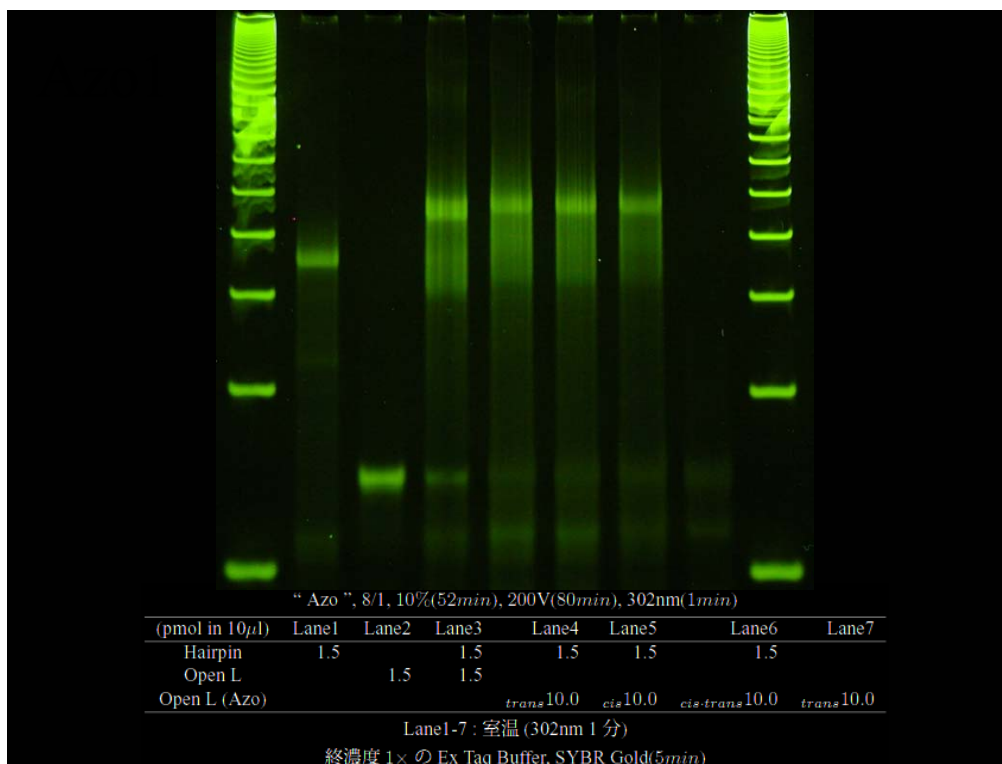
来年度において，この配列セットもしくは新たに設計した配列セットを用いて conformational addressingの実験を進める計画である。

○光制御

光制御の実験は，以下の図の配列を用いて行った．Xがアゾベンゼンの挿入を表している。

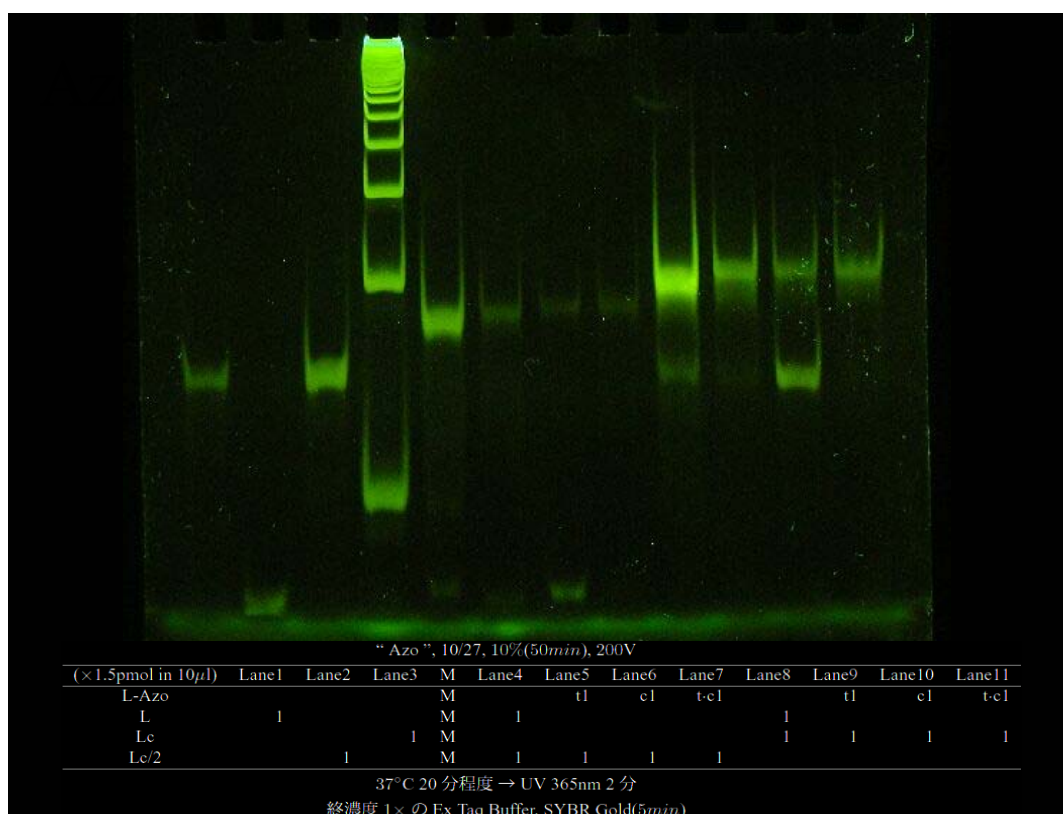


以下は，この配列を用いて最初に行った実験の結果である。



Lane 4は、Open Lにジアゾベンゼンが挿入されているもの(trans体)とHairpinを混ぜた結果であり、ジアゾベンゼンが挿入されていないOpen Lに対する結果(Lane 3)と同様であった。Lane 5は、Open Lに紫外光を照射しcis体に異性化してから混ぜたものだが、Lane 4と同じ結果になってしまった。これは、照射した紫外光の波長が302nmと短かったために、cis体への異性化が十分でなかったことが原因と考えられる。Lane 6は、cis体のまま混ぜた後に可視光を当ててtransにしようとしたものであるが、そもそもcis体に異性化していなかったと考えられる。Lane 7は、ジアゾベンゼンが挿入されたOpen Lのみのレーンである。ジアゾベンゼンが挿入されたOpen LはSYBRに染まらずに確認できなかった。これは、ジアゾベンゼンが蛍光のクエンチャとして働いているためと考えられる。

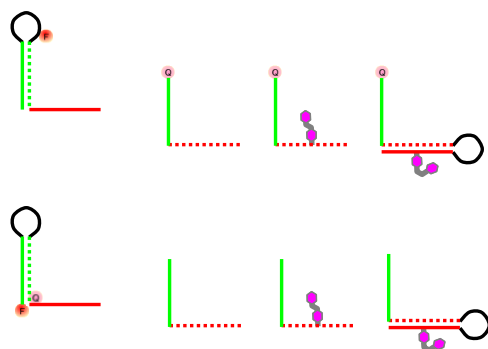
以下は、特に紫外光の波長を365nmとした場合の結果である。



Lcは(ジアゾベンゼンが挿入された)Open Lに相補的な配列、Lc/2はOpen Lのうちジアゾベンゼンが挿入されている側の半分に相補的な配列である。Lane 5はtrans体とLc/2がハイブリダイズした結果である。蛍光は薄いですが、ジアゾベンゼンが挿入されていないOpen Lに対する結果と同じバンドが得られた。Lane 6はcis体に異性化してから混ぜた結果である。365nmを2分間照射した。紫外光を照射する直前に37度で20分間保存した。ハイブリダイズしていないLc/2が確認できたので、Lc/2とハイブリダイズできないcis体が存在すると思われる。Lane 7はtrans体のまま混ぜてから37度に保存した後、cis体に異性化しよ

うとして紫外光を照射したものだが，Lane 5のtrans体とかわらない結果となり，二本鎖では異性化が困難であることがわかった．Lane 8-11は，Lc/2の代わりにLcを用いた結果であり，特にLane 10はLane 6と同様の結果となった．

実験結果を反映して，検出のための蛍光分子も挿入されたDNA分子の設計を再び行い，以下の図のような実験を計画した．



オープナーの配列は以下のようである．

5'-CCGCACGAGACCCCACCCTC (Azo) -GAAAAAG-GAGGGTGGGGTCTCGTGCGG-TATAAAACCCTATCTATGCG-T- (Dabcyl) -3'

5'-GAGGGTGGGGTCTCGTGCGG (Azo) -TATAAAACCCTATCTATGCG-3'

5'-CCGCACGAGACCCCACCCTC (Azo) -GAAAAAG-GAGGGTGGGGTCTCGTGCGG-TATAAAACCCTATCTATGCG-3'

これに対して浅沼研究室により実際に以下の配列を合成していただいた．

5'-GAXGGXGTXXGGXGGXTCXTCXGTXXGXGG-TATAAAACCCTATCTATGCG-T- (Dabcyl) -3'

ジアゾベンゼンは9つ挿入されている．また，ヘアピンの配列の合成も業者に発注したがって，上の図にあるうち，右の列の二つの配列を除いて，左の6つは既に合成されている．下の左から3番目は，既に実験において用いたものであり，ジアゾベンゼンは三つ挿入されている．

残念ながら実験室のある建物が耐震工事のために使用できなかったため，実験は来年度に行う予定である．

●大内グループ

○階層型分子メモリの構築

Nested Primer Molecular Memory (以下，NPMMと呼ぶ)は，塩基配列でコードされたデータ部とデータ部の両端に階層的に付加されたアドレス部からなるものであり，データ部

を読み取る際にはNested PCRを実行する。本年度は、NPMMのスケールアップのために中規模のメモリを想定した実験と大規模化へ向けた配列設計、及び、構築の指針について検討した。

前年度は、3階層3配列(各階層のアドレス部が3種類で3階層)のNPMMに対して、各Nested PCR後の溶液について適切にアドレッシングが実行されていることを示すことができた。本年度は、この27種類の配列を用いて12,166アドレスに相当するNPMMをシミュレートする実験を行った。各階層に23種類のアドレスを想定すると各階層でのNested PCRは、現在の溶液から1/23のメモリのみをPCRによって増幅させることに相当する。このようにターゲットとなるメモリの濃度が各階層毎に1/23づつになるようにメモリの濃度を調整した実験系を構築して、3階層23配列に相当するNPMMによる読み出し実験を行った。この結果、3階層3配列で行った実験プロトコルよりもプロトコルの至適化が必要ではあったが、ターゲットとなるメモリ分子のみの増幅に成功した。3回のPCR後の溶液を濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)を用いて分離するにより、1種類のメモリ分子のみが残っていること、また、ターゲットメモリ分子を人工的に合成したものと混合した溶液をDGGEで分離した結果も1種類になること、を示すことで適切なアドレッシングが行えたことを確認した。

また、1億超アドレスを持つNPMM作成に向けて、塩基配列の設計手法を検討した。陶山グループによるrandom generate法に加えて、PCRにおける配列の特異性を向上させるために、3'末端側の塩基が特にミスハイブリダイゼーションしないための制約条件を考慮した塩基配列手法を採用した。制約がより厳しくなるために制約を満たす配列の本数をより多くする工夫として、2 step search 法を新たに提案して、従来のrandom generate 法よりも多くの配列を探索できることを示した。設計した配列によって、5階層40配列程度のNPMMを構築可能と考えられる。

○形態変化を利用した分子アドレッシング

こちらについては、萩谷グループと共同で行っている。萩谷グループで設計したヘアピン構造をとる一本鎖DNA塩基配列を用いて、それらを2つ連続的に結合した分子に対してのアドレッシング実験を行い、適切に実行されていることを確認した。

ヘアピンを開くためのオリゴマーをオープナーと呼んでおり、各ヘアピンを開くためのオープナーはそれ以外のヘアピンを開かない選択性と呼ばれる性質をもっている必要がある。各オープナーがアドレスの一桁に対応する。2連続のヘアピンでは、2つ目のヘアピンは1つ目のヘアピンが開いているときにのみオープナーによって開くことが可能である。このように、ヘアピンが開くかどうかは、オープナーを入れる順番に依存し、これを順序性と呼んでいる。本年度は、2連続のヘアピンにおいて、2つのオープナーを入れる順番を変えて、その形態変化を電気泳動によって解析する実験を行った。その結果、選択性、順序性とも成り立つような形態変化が常温で可能であることを示した。

また、4連続のヘアピンを形成するための合成方法の検討を行った。2連続のヘアピンより4連続のヘアピンの方が総塩基数が長くなるために人工的な合成は困難になる。このため、ライゲーションなどを用いて、4連続ヘアピンを合成する必要があるが、その場合で

も合成できるサンプルの量が少なくなる問題があった。そこで、PCRとBioMag(Biotin付オリゴの除去)を用いた一本鎖精製を行うことである程度多くのサンプルを得ることが可能になった。

さらに、連続的にヘアピンを開く反応を行うために、余ったオープナーを除去する必要があるが、そのためにオープナーと相補対を形成するカバーと呼ぶ分子にBiotinをつけたものを用いた。BioMagによって余ったオープナーを除去できることを確認し、連続的にヘアピンを開くことが実現可能であることを示した。

●陶山グループ

(1) ヘアピン構造単位をひとつもつDNA分子メモリ素子の読み書き消去の最適化

ヘアピンDNA分子の両末端に導入したTAMURAとDabcylによるFRETを利用して、ヘアピンDNA分子の融解曲線、ヘアピンDNA分子とデータDNA分子との複合体の融解曲線、複合体形成反応の緩和時間などを様々な条件の下で測定した。これらの実験結果を基にして、書き込みと消去の最適温度、書き込みと消去の際の温度変化速度の最適条件を決定した。その条件の下でヘアピンDNA分子メモリへの読み書き消去の操作を行い、連続的に50回の書き込みと消去を繰り返しても安定して動作することが確認された。この結果が得られたことにより、ガラス基板にヘアピンDNA分子を固定して赤外レーザー照射で温度制御をした場合にも、データの読み書き消去を繰り返して行える目処が立った。

(2) ガラス基板への赤外吸収色素の塗布方法とヘアピンDNA分子の固定方法の最適化

ガラス基板上にヘアピンDNA分子と赤外線吸収色素をより均一に塗布して固定する方法の検討を行なった。ヘアピンDNA分子を共有結合で末端固定するための金と赤外線吸収色素を混合して蒸着する方法を試みた。また、赤外レーザー照射による読み書き消去の最適条件の決定を容易にするために、より広範囲の温度制御が可能な新しいチャンバーの設計と製作を行った。

(3) 設計した配列の正規直交性を評価する実験

設計した正規直交配列のハイブリダイゼーション反応速度の一様性と増幅一様性を実験により調べた。これらの性質は、ヘアピンDNA分子メモリや階層的分子アドレッシングにおいて、アドレスやデータの内容に依らないメモリ操作の実現のために必要とされるが、理論的評価方法がないため、実験による評価が必要である。正規直交配列を連結して作成した600種類の配列のPCR増幅の一様性を調べたところ、実験誤差の範囲内で増幅率が一樣であることがわかった。また、300個の正規直交配列の中からハイブリダイゼーション効率が大きく異なる6個の正規直交配列を選択し、それらのハイブリダイゼーション反応の速度を濃度や温度の条件を変えて調べた結果、配列によって速度が大きく異なることがわかった。

(4) 今後の見通し

繰り返して読み書き消去が行なえるヘアピンDNA分子を開発することができた。今後、ヘアピンDNA分子メモリのアドレッシングのエラーを評価する実験を行なうとともに、そ

のようなヘアピンDNA分子と赤外吸収色素をガラス基板上に塗布して固定する方法の最適化を一層進め、アモルファスDNA分子メモリを完成させる。また、データDNA分子のアドレスの先に付けるペイロードを工夫し、DNAインキや遺伝子の微量分析のためのプログラム可能なマイクロリアクタを実現する。一方、アモルファスDNA分子メモリや階層的分子アドレスリングの一様性と速度を向上させるために、正規直交配列のハイブリダイゼーション反応速度の配列依存性の原因を明らかにするとともに、より誤差の少ない解析方法により正規直交配列の増幅効率の一様性を評価する。

●岩崎・谷田グループ

陶山グループと連絡を密に取りつつ、光アモルファスDNA分子メモリの基礎技術を開発することを目的とする。今年度は以下のような研究成果が得られた。

○レーザー光を用いたメモリDNA分子の位置制御と空間局所的反応技術の開発

アモルファスDNA分子メモリ上での光を利用したデータ転送をめざし、光マニピュレーションを利用したDNAの位置制御やレーザー照射によるDNAの空間局所的反応技術に関する実験を行った。まず、異なる波長の二本のレーザー光を用いたDNA操作システムを構築し、マイクロメータスケールでのDNA操作方法について検討した。光吸収材料としてチタニルフタロシアンを塗布したDNA反応基板を作製し、効率的に温度を制御するための膜厚等の条件を決定した。このDNA反応基板を用いて、データDNA分子を結合したビーズを光ピンセットにより輸送し、その後、別の波長のレーザーを照射して溶液の温度変化によりビーズからDNAを解放する一連の操作を実行できることを示した。また、位置制御用と反応制御用のレーザーがほとんど相互に影響することなく、DNAの位置・反応を独立に制御できることを確認した。本手法は、DNA反応基板上に固定化したDNAの解放にも適用できる。さらに、開放されたDNAが溶液中に拡散することを防ぐため、基板上に作製したマイクロウェルアレイを利用する方法について検討し、マイクロウェル内の温度を上昇させてDNAを解放できることと、DNA結合ビーズをマイクロウェル間で輸送できることを確認した。一方、垂直共振型面発光レーザー（VCSEL）アレイを用いた光マニピュレーションにより、データDNAを結合した複数個のビーズを鉛直方法に積み上げ、その状態で輸送できることを実証した。

これらの実験結果は、光によるDNA操作技術の可能性を探求したものであり、光アモルファスDNA分子メモリの実現に寄与するものと期待される。

○高密度にパターン化されたDNA分子の固定および検証実験

光アモルファスDNA分子メモリを実現するための基礎技術として、生体分子を固体表面に高密度で固定する技術を開発している。昨年度までに研究したタンパク質だけではなく、DNA分子についても、シリコン表面にSC1酸化膜を形成して、この上にOctadecyltrichlorosilane (OTS) の保護層を形成した上で、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて局所的に電流を流して新たにサブミクロンスケールの酸化膜を新たに作り、そこに今度は γ -aminopropyltriethoxysilane を (γ -APTES) 作用させてアミノ基を用意して、更

にグルタルアルデヒドをリンカーとして用いることで、 λ DNAやアミノ基を導入したDNAを固定することも可能であることを検証した。検証はサブミクロンスケールのパターンに固定されたDNA2本鎖ないしはDNAの2本鎖が何本か束になった状態のものをAFMによって観察することによって行った。そして、この検証に際して、単純なラインパターンに固定する実験だけでなく、格子状に配列したドットパターンに対してもラムダDNAを固定することを試み、DNA分子をライン間だけでなくドット間にも架橋するように固定させることがある程度可能であることが判明した。ただし、現時点ではパターン間隔はある程度制御できるが、DNAの配列パターンやDNAの長さを制御した上での固定の実験ではないので、そのままでは利用できないが、今後、DNAの配列や長さの制御によって、自律的にDNAメモリ分子を配置できるようになれば、基礎技術として利用できるようになると期待される。

●横森グループ

理論モデルの観点から、多相的分子インタラクションによる新しい分子コンピューティングの可能性の探究を進めた。研究実績の概要は以下の2つに分類される。

(1) 〈無細胞タンパク質合成系による計算モデルの研究〉

無細胞タンパク質合成系を用いたまったく新しい分子コンピュータの方式を提案した(榊原康文「ナノテクノロジーハンドブック」)。この方式は、有限オートマトンという計算モデルをタンパク質合成系と拡張コドンを用いて実現し、試験管の中でその計算を実行する「新しいタイプのDNAコンピュータ」を提案したものである。タンパク質合成系を用いることにより、従来のDNAコンピュータにおいて最大の問題となっていた、DNA分子の水素結合を用いたハイブリダイゼーションという演算による精度の低さとエラーの多さを解決することができた。具体的な手順として、まず入力文字をあるRNA部分配列にコード化し、有限オートマトンの状態もRNA部分配列にコード化した。これらのコード化された配列の最後に、受理されたか否かを検出するためにGFPレポート遺伝子を加えた。次に、転移RNAがもつアンチコドンを用いて、有限オートマトンの状態遷移関数をコード化した。このように、入力文字列をコード化したRNA配列をメッセンジャーRNAとして、また拡張アンチコドンをもつ転移RNAを無細胞タンパク質合成系に加えて、タンパク質合成反応を実行した。このとき、入力文字列が正しい場合には、タンパク質合成が最後まで実行され、GFPタンパク質が合成されることにより発光が検出された。このようにして有限オートマトンはその文字列を受理したことが確認できた。

(2) 〈分子計算シミュレータ LMNtal の設計と実装〉

階層的グラフ書換えに基づく並行言語モデル LMNtal について下記の研究開発を行った。

言語仕様の詳細検討：2002年度に設計した基本言語仕様について、セル(膜で囲まれた分子)の複製および消去を実現するための拡張を行った。この拡張を実現するために、プロセス文脈(膜内の不特定多数のアトムとマッチする言語機能)に関する仕様を詳細に再検討し、新たな言語規則の形でまとめた。また上記の拡張に伴い、言語の操作的意味論(構造合同規則および遷移規則)も詳細に再検討し再定義した。(これらの結果は「コン

「コンピュータソフトウェア」誌に採録され、2004年前半に掲載予定である。）

処理系の開発：2002年度の試作処理系をベースに、2003年度には、今後開発予定の本格的並列分散処理系開発のベースとなる強固な基準実装の構築を進めることとした。Rubyで全体の枠組を試作したのち、Javaで処理系を作成して最初の版を公開した (<http://www.ueda.info.wased.ac.jp/lmntal/>)。本処理系はまだ開発過程にあるが、LMNtal言語仕様のうち、プロセス文脈の拡張機能などを除く大多数の機能を提供しており、さらに数値演算などを記述するために書換え規則に条件部（ガード）を指定する機能を設計実装している。また、Javaで記述したインラインコードを呼び出す機能および簡単なモジュール化機能を持ち、ライブラリの蓄積による発展の礎を与えることができた。

プログラミング例の蓄積：LMNtalの重要な応用分野として自己組織化原理に基づくプログラミングがあり、この領域の開拓は分子プログラミングの発展のみならず、プログラミングパラダイム全般にとっても重要である。そこで、自己組織化と関連の深い題材としてPCR、セルオートマトン、二分子生物ロボット、平衡二分木などをとりあげ、例題の記述実験を通じて、LMNtalが自己組織化反応のプログラミングのための記述力と簡潔性の両方を備えていることを確認した。

3. 研究実施体制

萩谷グループ

- ① 研究分担グループ長：萩谷 昌己（東京大学大学院情報理工学系研究科・教授）
- ② 研究項目：プロジェクト全体の統括・形態変化と位置情報を利用した分子メモリ

陶山グループ

- ① 研究分担グループ長：陶山 明（東京大学大学院総合文化研究科・教授）
- ② 研究項目：位置情報を利用した分子メモリ

横森グループ

- ① 研究分担グループ長：横森 貴（早稲田大学教育学部・教授）
- ② 研究項目：多相的分子インタラクションの解析と設計のための基礎理論

岩崎・谷田グループ

- ① 研究分担グループ長：岩崎 裕（大阪大学産業科学研究所・教授）
- ② 研究項目：位置情報と光を利用した分子メモリのための基礎技術

大内グループ

- ① 研究分担グループ長：大内 東（北海道大学大学院工学研究科・教授）
- ② 研究項目：アドレスの階層化に基づいた高信頼性アドレッシングの実現と高速化に関する基礎研究

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- 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. Also in *DNA Computing, 9th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA9, Madison, WI, USA, June 2003, Revised Papers*, Lecture Notes in Computer Science, Springer, Vol.2943, 2004, pp.74-85.
- Hiroki Uejima and Masami Hagiya: Analyzing Secondary Structure Transition Paths of DNA/RNA Molecules, *Ninth International Meeting on DNA Based Computers, Preliminary Proceedings*, 2003, pp.92-96. Also in *DNA Computing, 9th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA9, Madison, WI, USA, June 2003, Revised Papers*, Lecture Notes in Computer Science, Springer, Vol.2943, 2004, pp.86-90.
 - Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto, Hiroki Uejima, Masami Hagiya, Kensaku Sakamoto and Azuma Ohuchi, Conformational Addressing using the hairpin structure of single-strand DNA, *DNA9, Ninth International Meeting on DNA Based Computers, Preliminary Proceedings*, 2003, pp.197-201. Also in *DNA Computing, 9th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA9, Madison, WI, USA, June 2003, Revised Papers*, Lecture Notes in Computer Science, Springer, Vol.2943, 2004, pp.219-224.
 - 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)
 - 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)
 - Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: Nearest-Neighbor Thermodynamics of DNA Sequences with Single Bulge Loop, *DNA9, Ninth International Meeting on DNA Based Computers, Preliminary Proceedings*, 2003, pp.150-152. Also in *DNA Computing, 9th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA9, Madison, WI, USA, June 2003, Revised Papers*, Lecture Notes in Computer Science, Springer, Vol.2943, 2004, pp. 170-179.
 - Masahiro Takinoue and Akira Suyama: Development of a molecular memory based on hairpin DNA. *CBI Journal* (投稿中).
 - 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).
- Fumika Sumiyama, Yusuke Ogura, and Jun Tanida: Stacking and translation of microscopic particles by means of 2×2 beams emitted from a vertical-cavity surface-emitting laser array, *Applied Physics Letters*, Vol. 82, No.18, pp.2969-2971 (2003).
- Yusuke Ogura, Takashi Kawakami, Fumika Sumiyama, Akira Suyama, and Jun Tanida: Parallel translation of DNA clusters by VCSEL array trapping and temperature control with laser illumination, *DNA Computing, 9th International meeting on DNA Based Computers, DNA9*, Madison, U. S. A., June 2003, Revised Papers, Lecture Notes in Computer Science, Springer, Vol. 2943, 2004, pp. 10-18.
- 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.
- S. Antoranz Contera, H. Iwasaki and S. Suzuki: Ambient STM and in-situ AFM Study of Nitrite Reductase Proteins Adsorbed on Gold and Graphite, *Ultramicroscopy*, 97 (2003) pp.65-72.
- L. Yan and H. Iwasaki: Fractal Aggregation of DNA after Thermal Denaturation, *Chaos, Solitons and Fractals*, 20 (2004) pp.877-881.
- Akihiro Takahara and Takashi Yokomori: On the computational power of Insertion-Deletion Systems, *Natural Computing*, Vol.2, No.4, pp.321-336, 2003.
- Kazunori Ueda and Norio Kato, The Language Model LMNtal, In *Proc. Nineteenth Int. Conf. on Logic Programming (ICLP'03)*, LNCS 2916, Springer-Verlag, pp.517-518, 2003.
- 上田和紀, 加藤紀夫: 言語モデルLMNtal. コンピュータソフトウェア, Vol.21, No.2 (2004), to appear.
- Yasubumi Sakakibara: DNA-based Algorithms for Learning Boolean Formulae, *Natural Computing*, Vol.2, No.2, 153--171, 2003.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数: 1件 (研究期間累積件数: 1件)