

「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、特に固有のアドレスを持ったメモリ分子を参照するための「分子アドレッシング」技術の開発を行う。生体分子、特に核酸（DNA・RNA）の大きな特徴は、塩基配列が異なれば異なる分子として振舞うことである。従って、一つ一つの分子は自分に固有のアドレスを持つことができる。さらに分子が固相に固定されている場合、個々の分子は固有アドレスに加えて、その位置のアドレスにより参照することが可能である。分子を位置アドレスにより参照するには、局所的な光の照射や温度の制御を行うとともに、光や温度による分子インタラクションを活用することが必要となる。

そこで本課題は、核酸分子の持つ固有アドレスによる参照と光や温度による参照を組み合わせ、多相的分子インタラクションに基づく分子アドレッシング技術の開発を行う。さらに、参照した分子を移動する技術および固有アドレスに従って規則正しく分子を配置する技術の開発を併せて行う。固有アドレスに従って規則正しく配置された分子メモリは、固有アドレスと位置アドレスの変換を可能にする。これはナノテクノロジーの基盤技術として期待される。また、固相上の分子メモリの基盤として液相の分子メモリの開発も行い、そのアドレス空間の限界に挑む。液相の分子メモリの直接的な応用として、分子認証（DNAインキ）技術の開発を行う。

本課題でこれまでに開発した分子アドレッシング技術は、メモリ分子素子に関する技術と固相上の分子メモリに関する技術に分かれる。前者に関しては、巨大なアドレス空間を実現するために階層的なアドレスを持つメモリ分子素子の開発を行った。具体的には、NPMM（Nested Primer Molecular Memory）と conformational addressing である。後者は固相上の分子メモリにも応用可能である。また、アドレス情報としての光や温度に感応するメモリ分子素子の開発を進めた。NPMMに関して、今年度は4階層10配列（10,000アドレス空間）のNPMMの構築を行い、5つのサンプルアドレスに対するアドレッシングに成功した。conformational addressingに関しては、4連続ヘアピンのアドレッシングのための反応条件（温度およびMgイオン濃度）の検討を行った。また、紫外光・高温によって有効となるオ

ープナ的设计を行い、実際に紫外光・高温により conformational addressingが可能であることを確認した。

固相上の分子メモリに関して、今年度は2つの固有アドレスをもつアモルファスDNA分子メモリを作製し、赤外レーザー照射とハイブリダイゼーション反応により、選択的データ書き込みとデータ消去を50回以上繰り返して行うことに成功した。また、結晶性DNAメモリを階層型自己集合によりボトムアップ的に作製する実験を行い、ゲル電気泳動および原子間力顕微鏡を用いて分析した結果、第4階層まで形成された結晶性DNA分子メモリのナノ構造体が確認された。さらに、このようなナノ構造体を固相に固定することを目指し、 λ DNAやアミノ酸基を導入したDNAの固定化が可能であることを示した。

参照した分子を移動する技術、特に光でDNAを制御する技術に関しては、VCSELアレイを用いた光マニピュレーションによる、微小ビーズに結合したDNA群の並列輸送や、レーザー照射によるミクロンオーダーでのDNA反応制御の原理を実証した。

2. 研究実施内容

● 萩谷グループ

プロジェクト全体の統括を行うとともに、主として形態変化を利用した分子メモリに関して以下の項目の研究を行っている。

- (1) 分子メモリ的设计と実装
- (2) 多状態DNA分子的设计と実装
- (3) 理論研究

(1) 多階層のアドレスを持つ分子メモリにおける分子アドレッシングを、階層の数に依存しない手間で行うために、分子の逐次的かつ自発的な形態変化を利用した分子メモリ的设计と実装を行っている。具体的には、萩谷たちが従来から研究を行っているWPCR(whiplash PCR)の分子アドレッシングへの応用と、連結したヘアピン構造を逐次的にほどく反応を利用した分子アドレッシング (conformational addressing) の技術の開発である。

WPCRに関しては、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。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、特定のアドレスを持つ微少なDNA分子の塩基配列上にコードしたデータを特異的に読み出す手法として、WPCRが有効であることが示された。

conformational addressingに関しては、大内グループと共同で引き続き実証実験を行った。ゲル電気泳動により、2および3連続ヘアピンのアドレッシングが成功していること

を確認したが、4連続ヘアピンについては確認できなかった。そのため、蛍光による検出を試みた。わずかながら4連続ヘアピンのアドレッシングが蛍光により確認できたが、来年度、蛍光を用いた実験を本格的に進める。また、40本の配列から成る配列セットの設計も行ったが、まだ実装までには至っていない。

(2) conformational addressingの配列設計の基礎となる、複数の安定状態を持つ分子(DNAやRNA)を設計する技術に関する研究を進める。また、温度や光によるconformational addressingの技術を開発する。さらに、conformational addressingにおける分子メモリ素子を発展させ、アドレッシングだけでなく、ブール演算に代表される演算機能を持った汎用の分子システムの開発を進める。

温度制御に関しては、陶山グループで開発している温度制御の仕組みとconformational addressingと組み合わせることにより、温度によるアドレッシングが可能なメモリ分子素子の開発を行った。ヘアピンのステムの長さが8ベースのオープナを用いて、25度と50度の間で温度制御が可能なことを確認した。すなわち、25度(室温)では、オープナはメモリ分子のヘアピンをほとんど開くことがないが、温度を50度に上昇させると、メモリ分子のヘアピンが次第に開く状況を観測することができた。

光制御に関しては、東京大学先端科学技術研究センターの浅沼浩之氏が開発しているアゾベンゼンが挿入されたDNA分子を用いて、温度制御と同様に、オープナのヘアピンの開閉を光によって制御する技術の開発を行った。ヘアピンのステム部分にアゾベンゼンが挿入されており、紫外光をあてることにより、アゾベンゼンがtrans体からcis体に異性化すると、ヘアピンの T_m が下がってヘアピンが開き、オープナとして働くことができるようになる。実際に、40度の状況で光による制御が可能であることを確認した。オープナのヘアピンのステムは10ベースであり、これに4個のアゾベンゼンが挿入されている。

汎用的な分子システムに関しては、環境からの入力(例えば、光、温度変化、塩濃度変化)を計測して、それに従って情報処理(すなわち状況判断)を行い、最終的に何らかの出力(光や適当な分子)を行う分子マシンを構想した。ヘアピン構造やバルジ構造に基づく分子マシンが集まった分子システムによって、ブール演算に代表される汎用的な並行計算を実現することを目指している。その一つとして、ANDゲートをバルジ構造によって実現する方法を提案した。バルジ構造は、二つの一本鎖DNAが入力として与えられたときのみ、二番目のバルジを作っていた一本鎖DNAが出力として放出される。このシステムが実際に動作することを実験により確認した。

(3) 理論に関しては、以上の研究成果を踏まえて、多相的分子インタラクションの新たな可能性について検討を進めた。

●陶山グループ

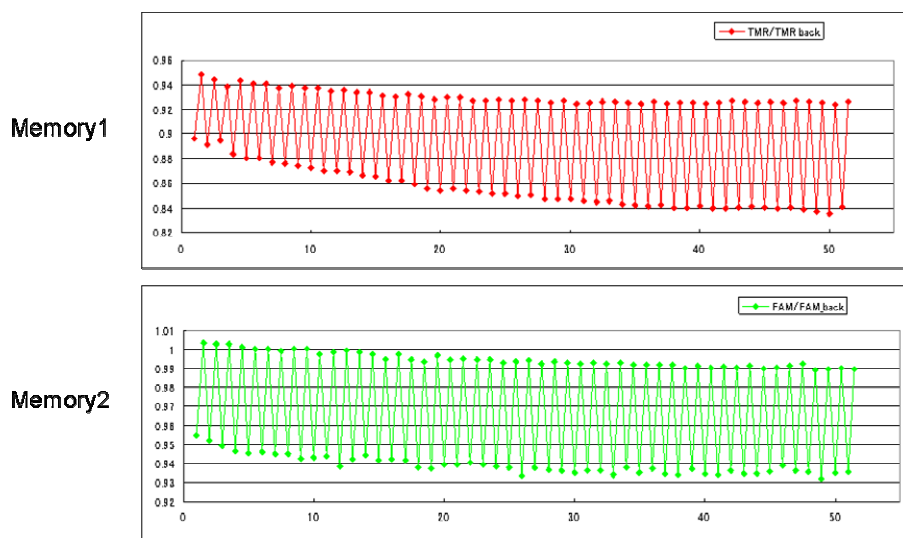
陶山グループでは、昨年度までの研究成果を踏まえて、(1)アモルファスDNA分子メモリの製作、(2)アモルファスDNA分子メモリの応用、(3)結晶性DNA分子メモリの開発、(4)配列セットの特性の向上に関する研究を行った。以下にその具体的内容を述べる。

(1) アモルファスDNA分子メモリの製作

最も簡単なアモルファスDNA分子メモリは、アドレスをひとつ持つヘアピンDNA分子を固定したメモリである。昨年度までの液相実験によりメモリ分子として動作することが確認されたヘアピンDNAメモリ分子を基板表面に固定し、アモルファスDNA分子メモリを作製した。

温度制御可能なチャンバーに基板を装着し、FRETを利用して、基板表面に固定したヘアピンDNAメモリ分子の融解曲線と、そのヘアピンDNAメモリ分子とデータDNA分子とのハイブリッドの融解曲線を測定し、アモルファスDNA分子メモリの書き込み・消去の温度条件を決定した。また、NDフィルターを用いて照射する1064nmのYAGレーザー光の強度を調整し、書き込みおよび消去のためのレーザー光の強度を決定した。これらの結果に基づいて、アモルファスDNA分子メモリの書き込み・消去の基本動作を確認する実験を行い、赤外レーザー光の照射により繰り返してデータの書き込み・消去が行えることを確認した。これにより、アモルファスDNA分子メモリの基本技術の開発に成功した。

さらに、選択的に分子アドレッシングが可能であることが確認された二つのヘアピンDNAメモリ分子を用いたアモルファスDNA分子メモリを作製し、アドレス特異的に書き込みおよび消去ができることを、蛍光色が異なる2種類のFRETを利用して測定する実験を行い、分子アドレッシングによる選択的書き込みを50回以上、繰り返して行うことができることを確認した。(下図)



分子アドレスを2つもつアモルファスDNAメモリの書き込み・消去実験

(2) アモルファスDNA分子メモリの応用

アモルファスDNA分子メモリを利用してプログラム可能なマイクロリクタやアセンブリプレートを開発するために、大阪大学の谷田研究室と共同で、ヘアピンDNA分子を固定

したマイクロビーズと光ピンセットを利用してデータDNA分子をマイクロウェル加工した基板上で移動する実験を進めている。

(3) 結晶性DNA分子メモリの開発

結晶性DNA分子メモリは、特定のパターンにしたがって、ナノスケールでDNAメモリ分子を配置させたメモリである。メモリ分子が特定の位置関係を持って配置されているため、分子アドレッシングによりナノメートルスケールでの位置アドレッシングを行うことができる。正規直交配列を連結した一本鎖のDNA分子を用いて、階層型の自己集合によりボトムアップ的に結晶性DNA分子メモリを作製する実験を行った。形成されたメモリ構造体を含む溶液をゲル電気泳動により分析した結果、自己集合により第4階層まで形成されたDNAナノ構造体に対応するバンドが確認された。さらに、その溶液を大阪大学岩崎研究室と共同して原子間力顕微鏡により分析した結果、対応する大きさをもつDNAナノ構造体が観察された。

(4) 分子アドレッシング用の配列セットの開発

アモルファスDNA分子メモリや階層的分子アドレッシ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研究を行った。ストップフロー装置を用いて、正規直交配列をもつ相補鎖同士のアニール速度の鎖濃度、塩基配列、温度依存性を詳細に調べた。見かけ上のハイブリダイゼーション反応速度は二分子反応モデルに従う濃度依存性を示したが、正規直交配列の種類により速度の値は大きく異なった。速度の正規直交配列依存性の原因としては、正規直交配列をもつ一本鎖DNA分子が形成する局所的な二次構造の影響、相補鎖がハイブリダイズする過程で形成される誤った鎖会合核の影響などが考えられるが、まだ原因を完全に断定するにはいたっていない。

●谷田・岩崎グループ

○光DNA制御技術に基づくアモルファスDNAメモリの空間局所制御

谷田グループでは光DNA制御技術の開発を行ってきた。本年度は、位置情報を利用したアモルファスDNAメモリ構築への具体的方式として、ヘアピンDNAを含む系の反応を光を用いて制御するための基本原理の確認を行った。実験では、陶山グループが設計したヘアピンDNAと、ヘアピンDNAの配列の一部と相補的なDNA（データDNA）の組を用いた。ヘアピンDNAの自己アニール（ヘアピン構造形成）における T_m は、ヘアピンDNAとデータDNAとの T_m より低く設定されており、高温状態から急冷するとヘアピン構造を形成し、徐冷するとヘアピンDNAとデータDNAがハイブリダイズする。これらの二状態は、データの書き込み状態と消去状態に対応づけることができる。

直径6ミクロンのポリスチレンビーズの表面にヘアピンDNAを固定し、レーザービームを照射して溶液の温度を変化することで、DNAメモリの状態を制御する。まず、ヘアピンDNAとデータDNAのディナチュレーションには3mW以上の光パワーが必要であることがわかった。次に、ヘアピンDNAとデータDNAのハイブリダイゼーションのための照射条件について

て検討した。ヘアピンDNAの結合したビーズを含む溶液と蛍光付きデータDNAの溶液を混合し、レーザーのパワー、照射時間、パワー変化レートなどレーザー照射条件をさまざまに変化させ、適切な条件を求めた。その結果、2mWで30秒照射後、30秒間でパワーを線形的に零まで落とすことにより、データDNAをヘアピンDNAとハイブリダイズすることができた。なお、この反応は、少なくとも10ミクロン以下の解像度で制御できる。このことは、10ミクロン程度のピッチで位置アドレスを割り当てられることを示している。

次に、得られた照射条件を用いて、ビーズへのデータDNAの書き込みと消去の繰り返し実験を行った。データDNAの結合状態を蛍光観察し、書き込みと消去のそれぞれの操作が期待どおり行われていることを確認した。また、4回の繰り返しにおいて、反応系の劣化がほとんどないことがわかった。ただし、反応効率を向上させるため、反応条件の詳細な検討が必要である。

○シリコン表面への高精度なDNA分子固定技術の開発

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DNA分子を固定する技術の開発を行った。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 λ -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。本年度は特に、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 γ -aminopropyltriethoxysilane (γ -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。

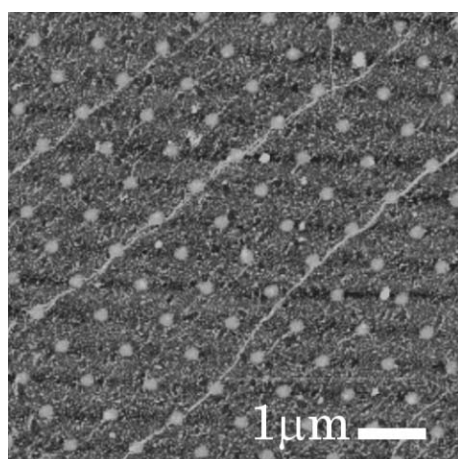


図1 酸化物ドットアレイ上に固定された λ -DNA分子

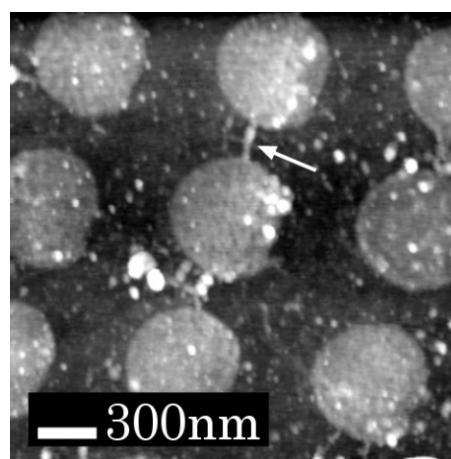


図2 酸化物ドット間を接続する形で固定されたDNA分子

●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分子メモリであり, データ部を読み取る際にはNested PCRを実行する. 本年度は, NPMMのスケールアップを行い, アドレッシングの評価を行いながら, さらなるスケールアップのための問題点の絞り込みを行った

まず, 4階層10配列のNPMMを構築するために, Parallel Overlapping Assembly (POA)法に基づく作成方法を採用し実際に作成した. 1万のアドレス空間を持つNPMMを構築し, そのうち16個のアドレスに対応するデータとしてデータ0を格納し, 残りにはデータ1を格納する. データ0とデータ1を表すDNAの長さを変えることでNested PCR後に電気泳動によってどちらのデータが読み出されたかを検出することとした. ランダムな操作ではより取り出しにくいと思われるデータ0を格納したアドレスを2種類, データ1を格納したアドレスを3種類についてNested PCRによるアドレッシングを行って, 正しいデータ長が検出できた. このことから, 1万のアドレス空間をもったNPMMについての構築に成功したといえる.

また, より大規模なNPMM構築を行うために, 5階層16配列のNPMMの構築, アドレッシング実験を上記と同様の実験系で行った. その結果, 5階層目のアドレッシングについて, 非特異的なPCR産物が多数増幅される現象があった. しかしながら, 4階層目までの4階層16配列でのアドレッシング実験(約65, 536のアドレス空間)で有望な結果を得た. ここでは, データ0をもつDNAメモリがデータ1をもつDNAメモリに対する相対量が1/256となっており, やはり偶然にデータ0が取り出される確率は小さくなっている. この状況で5種類のアドレッシングを行った結果, 4種類については, 適切に動作していることを確認した. 特に, 相対的なDNA量が少ないデータ0を持つメモリに対して, アドレッシングによりデータ0を出力できており, 今後の大規模化についても有望な結果であるといえる.

○形態変化を利用した分子アドレッシング(conformational addressing)

萩谷グループと共同でヘアピン開裂を利用したconformational addressing)に関する実験を行った. 本年度は, 昨年度までで合成することのできた4連続ヘアピンについて, アドレッシングに関する実験を行った. 電気泳動及び蛍光プローブによる二種類の方法で4連続ヘアピンの動作確認実験を行った. ヘアピン構造のステム部分の安定性を下げ, ヘアピンが開く反応を促すために反応温度を上げるのが有効であることがわかった. また, Buffer中のMgイオン濃度によって, 溶液中でのDNA相補配列の結合, 解離のバランス及び速度が大きく影響されることを蛍光プローブによる検出によって確認された. これがヘアピン構造の状態遷移動作にも大きく影響していると考えられるため, 反応温度・Mgイオン濃度・DNA濃度でヘアピン構造の動作に適している範囲を現在も調査中である. また, 溶液中の蛍光プローブによるヘアピンの動作確認において4連続ヘアピンが動作していると思われる兆候は見られたが, 蛍光プローブとヘアピン構造を開くために必要なオープナーの干渉で蛍光プローブが誤動作してしまう場合があるので, オープナーの形状について

検討も行った。

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

谷田グループ

- ① 研究分担グループ長：谷田 純（大阪大学大学院情報科学研究科，教授）
- ② 研究項目：位置情報を利用した分子メモリのための基礎技術開発

大内グループ

- ① 研究分担グループ長：大内 東（北海道大学大学院情報科学研究科，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

(1) 論文発表

- D.Blain, M.Garzon, S.Shin, B.Zhang, S.Kashiwamura, M.Yamamoto, A.Kameda, A.Ohuchi: "Development, Evaluation and Benchmarking of Simulation Software for Biomolecule-based Computing", *Natural Computing*, Vol.3, No.4, pp.427-442, 2004.
- 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, pp.125-140, 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 Computing, 9th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA9, Madison, WI, USA, June 2003, Revised Papers, Lecture Notes in Computer Science*, Springer, Vol.2943, pp.219-224, 2004.
- S.Kashiwamura, A.Kameda, M.Yamamoto, A.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.
- S.Kashiwamura, M.Yamamoto, A.Kameda, T.Shiba, A.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.

- Y. Kita, A. Kameda, M. Yamamoto, A. Ohuchi: "Design of Soccer-ball-shape DNA Molecules and Preliminary Experiments in Vitro", Proceedings of The 10th International Symposium on Artificial life and Robotics (CD-ROM), pp.563-566, 2005.
- 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.
- 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", *Lecture Notes in Computer Science*, 2943, pp.10-18, 2004.
- Y. Ogura, T. Kawakami, F. Sumiyama, S. Irie, A. Suyama, and J. Tanida: "Methods for manipulating DNA molecules in a micrometer scale using optical techniques," Tenth International Meeting on DNA Computing, Preliminary Proceedings, pp.365-374, 2004.
- J. A. Rose and A. Suyama: "Physical Modeling of Biomolecular Computers: Models, limitations, and experimental validation ", *Natural Computing*, 3, pp.411-426, 2004.
- J. A. Rose, R. J. Deaton, and A. Suyama: "Statistical thermodynamic analysis and design of DNA-based Computers", *Natural Computing*, 3, pp.443-459, 2004.
- 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, pp.285-290, 2004.
- N. Takahashi, A. Kameda, M. Yamamoto, A. Ohuchi: "Aqueous Computing with DNA Hairpin-based RAM", Preliminary Proceedings of the Tenth International Meeting on DNA Based Computers (DNA10), pp.50-59, 2004.
- M. Takinoue and A. Suyama: "Molecular reactions for a molecular memory based on hairpin DNA", *CBI J.*, 4 (3), pp.112-120, 2004.
- M. Takinoue and A. Suyama: "Development of a molecular memory using hairpin DNA", Preliminary proceedings of DNA 10, C. Ferretti, G. Mauri, and C. Zandron, Eds., pp.436, 2004.
- F. Tanaka, A. Kameda, M. Yamamoto, A. 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.
- F. Tanaka, A. Kameda, M. Yamamoto, A. 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.

- Hiroki Uejima and Masami Hagiya: "Secondary Structure Design of Multi-state DNA Machines Based on Sequential Structure Transitions", 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, pp.74-85, 2004.
- Hiroki Uejima and Masami Hagiya: "Analyzing Secondary Structure Transition Paths of DNA/RNA Molecules", 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, pp.86-90, 2004.
- 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, pp.421-428, 2004.