

「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」技術の開発を行うものである。

大内グループは、Nested Primer Molecular Memory (以下、NPMM と呼ぶ)のさらなる大容量化のために、データの両側にアドレス部を配置するモデルを採用し、6 階層 10 配列(100 万アドレス)の NPMM の構築を行い、その動作確認を 6 つのアドレスに対するアドレッシングの結果をみることで行った。萩谷グループと大内グループが共同で開発しているヘアピン型 DNA を用いた conformational addressing については、4 連続ヘアピンの調整法を改良することで、サンプルを大量に得ることに成功した。また、反応温度を調整することによりアドレッシングの動作の順序性、選択性を満たしていることを確認した。さらに、蛍光検出法の検討を行い、すべてのヘアピンが開いたときのみ蛍光が低下する検出方法を確立した。以上の成果をもとに、実際に複数アドレスのメモリの構築を開始した。当初は $3 \times 3 \times 3$ のメモリの構築を目指して配列設計を行い2つの異なるアドレスのメモリ分子が排他的に動作することを確認した。

陶山グループは、アモルファス DNA メモリ基板上のメモリ分子の密度を向上させることをを行い、照射スポット当たり 1000 アドレスの密度での選択的書き込みが可能であることを示した。画像データの並列多重記録を可能するアモルファス DNA メモリ媒体である DNA-R/RW を考案し、その要素技術の開発を行った。結晶性 DNA メモリについては、DNA メモリ構造体の歪みを取り除いてより大きなメモリ構造体を構築できる可能性の高い方法を考案し、メモリ構造体を構築する実験を進めた。また、正規直交配列に対する分子アドレッシングを利用して、第三者による解読や不正コピーを防止するためのステガノグラフィーを施した最大で 6 万ビット(実験は 318 ビット)の DNA インクを開発した。陶山グループと萩谷グループは共同でアモルファスメモリと conformational addressing を融合する試みを行い、二桁のアドレスを持ち特定の温度においてのみ書き込み可能なメモリ素子を構築した。

谷田グループでは、DNA の位置情報を利用したアモルファス DNA 分子メモリの構築をめざし、

光を用いた並列 DNA 制御技術の開発を行ってきた。今年度は、ヘアピン DNA の系を利用し、光マニピュレーション技術と適切なレーザー照射条件による局所的 DNA 反応を組み合わせることにより、基板上の DNA を微小ビーズ表面へ転送できることを実証した。

さらに、分子認証も含めて、分子メモリ素子の応用の可能性について検討を進めた。大内グループの NPMM に関しては、分子の揺らぎを利用した DNA インキの可能性について検討を行った。また、陶山グループが開発しているアモルファスメモリとその分子アドレッシングに関しては、細胞の遺伝子発現の空間分布を計測するイメージング技術への応用、自律的分子輸送を利用した超微量分析技術への応用について検討を行った。

2. 研究実施内容

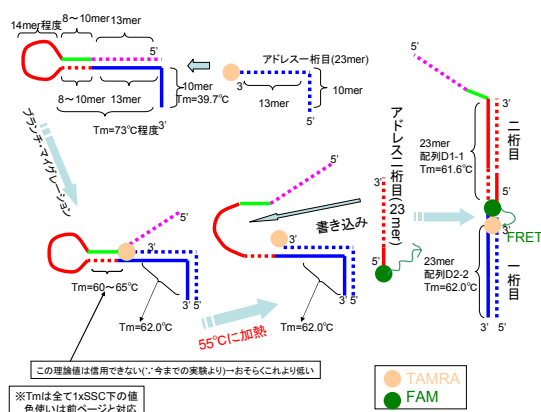
●萩谷グループ

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た。(1) conformational addressing に基づく分子メモリの実装 (2) 温度制御や光制御による分子アドレッシングを発展させた汎用的な分子システムの構築 (3) 分子認証を含む応用研究

(1) 大内グループと共同で 4 連続ヘアピンのアドレッシングに成功した。5' 末端からヘアピンを開くオープナのセットと 3' 末端から開くオープナのセットを用いて、どちらのセットを用いた場合においても、正しいオープナを正しい組み合わせで投入したときのみ、4つのヘアピンのすべてが開くことを確認した。このためには、反応温度、塩濃度、オープナのリード部の長さが重要であることがわかった。特に、リード部を 10 ベースにして反応温度を 45 度に設定することにより、オープナ同士の干渉を完全に避けることができた。ヘアピン分子の調製に関しては、大内グループとは異なる方法を開発した。新たに開発した方法においては、ヘアピンとその相補鎖から成る二本鎖を、ヘアピンのループ部分を糊代にしてライゲーションにより調製する。この方法は合成すべきオリゴの数は多いが、通常の本鎖のライゲーションを用いているため、ライゲーションが安定して行われ収量も多い。また、萩谷グループでは蛍光検出法の検討を行い、すべてのヘアピンが開いたときのみ蛍光が低下する検出方法を確認した。最後のヘアピンが開いたときに、一本鎖になったヘアピンのステムと隣接する一本鎖部分にハイブリダイズする二本のオリゴを用いる。これらのオリゴの末端には蛍光分子と消光分子を付けており、二本ともがハイブリダイズしたときのみ蛍光が減衰する。蛍光測定の結果、およそ三分の一の分子が最後のヘアピンを開いていることがわかった。以上の成果をもとに、実際に複数アドレスのメモリの構築を開始した。当初は $3 \times 3 \times 3$ のメモリの構築を目指して配列設計を行い2つの異なるアドレスのメモリ分子が排他的に動作することを確認した。

(2) 温度制御や光制御による分子アドレッシングを発展させ、汎用的な分子システムの構築に向けた研究を進めた。AND ゲート、紫外光に反応するセンサー、温度センサーの開発を昨年度より継続して行った。温度制御に関連して、陶山グループと共同でアモルファスメモリと conformational addressing を融合する試みを行った。アモルファスメモリは特定の温度において書き込みを許すメモリ素子から成る。これと conformational addressing を組み合わせ、下図のように、二桁のアドレス

を持ち特定の温度においてのみ書き込み可能なメモリ素子を構築した。配列設計は陶山グループが行い、基礎的な実験は萩谷グループが行った。これは、10,000 アドレスから成る高密度アモルファスメモリの基盤技術と考えられる。



(3) 分子認証も含めて、分子メモリ素子の応用の可能性について検討を進めた。大内グループの NPMM に関しては、分子の揺らぎを利用した DNA インキの可能性について検討を行った。また、陶山グループが開発しているアモルファスメモリとその分子アドレッシングに関しては、多種類の分子を高密度に固相上に固定するとともに固定した各分子種を個別に検出する技術であると位置づけ、細胞の遺伝子発現の空間分布を計測するイメージング技術への応用の可能性について検討を行った。

● 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 メモリ、(2)結晶性 DNA メモ、(3)DNA インキ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 メモリ

アモルファス DNA メモリのアドレス密度を向上させるために、ヘアピン DNA メモリ分子の固定化条件を再検討し、固定化量をこれまでの4倍以上に向上させた。2つのアドレスをもつアモルファス DNA メモリにおいて、ヘアピン DNA メモリ分子の量比を変えることにより等価的にアドレス密度を上げたメモリを作製し、選択的な書き込みが可能なアドレス数を調べた。照射スポット当たり 1000 アドレスでも選択的な書き込みができることが確認されたが、それ以上は検出感度の不足で確認が困難であった。アドレス数が数百を超えると2桁以上のアドレスが必要となる。萩谷グループとの共同で、2桁のアドレスをもつヘアピン DNA メモリの書き込み消去を行う方法を開発した。

アドレス密度の高いアモルファス DNA メモリの用途として、画像データの並列多重記録媒体としての利用を考え、2桁のアドレスから構成される DNA-R/RW を作製する方法を考案した。アドレス密度に対応する数と空間分解能をもつ画像データの並列多重記録が可能なメモリ媒体である。DNA-R/RW は既存の磁気メモリ媒体より高いメモリ容量を有する。しかし、実用性の点を考えると優位性はないとの指摘を受けた。そこで、アモルファス DNA メモリが DNA 分子で作られていること、そして高いアドレス密度を有するという、磁気メモリ媒体にはない特徴を最大限に活かした利用を

萩谷グループとともに検討し、多数の遺伝子発現の空間分布を同時計測するためのメモリ基板としての利用を考案した。ポストゲノム時代において遺伝子ネットワークの研究が最重要課題になっているが、そのために必要とされる多数の発現遺伝子の mRNA の空間分布を同時計測する技術はまだ確立されていない。アモルファス DNA メモリで作られた DNA-R/RW を利用すると、それを実現することができる。さらに、もうひとつの利用方法として、自律的分子輸送に基づく超微量分析システムのためのメモリ基板としての利用を考案した。分析のためのメモリ基板に書き込まれた経路情報にしたがって分子等が輸送されて分析が進む。谷田グループで開発が進められている光を用いた並列 DNA 制御技術と組み合わせることにより、シリコン基板の微細加工技術に基づく μ TAS 技術とは異なる、分子アドレッシングに基づく新しい μ TAS 技術の構築が可能となる。

(2) 結晶性 DNA メモリ

昨年度よりさらに大きな結晶性 DNA メモリをつくるために、構造の歪みが少なく、DNA 鎖の密度がより高い三角形敷詰め型 DNA 二次元ナノ構造体を Step-by-step アセンブリにより構築する方法を考案し、DNA 配列の設計を行った。ヘテロカップリング試薬を用いて、構造体の構築に必要な分岐 DNA 分子を調製し、結晶性 DNA メモリ構造体のアセンブリ実験を行うとともに、形成された構造体を分析する実験を進めた。

(3) DNA インク

正規直交配列がもつ正規性(長さ、安定性、増幅率が同一である)と直交性(ミスハイブリ、ミスブライミングがない)の性質を利用することにより、長ビットの暗号化と分子アドレッシングによる正確な解読が可能で、しかも第三者による解読やコピーを防止するステガノグラフィーを施した DNA インクを開発した。重要書類、貨幣、美術品、骨董品、高級ブランド品、産地・生産者指定食品等の認証、種々の情報の暗号化に利用が可能である。

これまでに設計した正規直交配列の集合は大きさが約 500 であり、2 桁の DNA コード化数(DCN)を用いると、最大で約 6 万(250×250)ビットの暗号化が可能な DNA インクを作ることができる。本年度はこれまでに増幅特性を調べた合計で約 600 種類の DCN のうち、318 種類の DCN を使用して 318 ビットの認証コードをもつ DNA インクを調製した。そして、318 ビットの DNA インクの認証コードを解読するための分子アドレッシング反応の確立、DNA インク及びの分子アドレッシング反応液のステガノグラフィー技術の確立、DNA インク紙片から認証コードを読み出すための基本技術の確立を行った。

●谷田グループ

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、レーザー照射による基板と微小ビーズ間での DNA の転送方法について検討した。これは、位置情報を利用したアモルファス DNA メモリの読み出しや書き込みの基本操作と位置づけられる。実験では、陶山グループが設計したヘアピン DNA、および、ヘアピン DNA の一部と相補的な DNA(データ DNA)を用いた。実験開始段階では、ヘアピン DNA をビーズ表面に固定するとともに、蛍光分子を結合したデータ DNA を、基板上に固定した相補鎖 DNA とハイブリダイゼーションさせた。パワー 2mW のレーザー

光で基板を照射し DNA を反応させながら、光マニピュレーションによりヘアピン DNA 付きビーズを移動させた。その結果、ビーズ移動経路上の基板の蛍光強度が低下するのに対し、ビーズの蛍光強度の増加が観察された。これは、データ DNA が基板からビーズに転送されたことを示している。現時点では、50 秒間の操作により、ビーズ 1 個あたりに結合可能な約 10^5 個のデータ DNA を転送できたと考えられる。転送レートは制御条件の最適化によりさらなる高速化が期待できる。この技術を利用すれば、任意の位置アドレスからデータ DNA の読み出しを実行できる。また、基板からの DNA 解離反応の最小反応幅を測定したところ、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下であった。さらに、応用システムにおける光 DNA 制御技術の有用性を示すため、暗号化画像メモリとその実装方法について検討した。まだ具体的な成果は得られていないが、分子反応系の調製を行い、実証実験の準備を進めている。

●大内グループ

次の二つの項目の研究を進めた(1)階層型分子メモリの構築 (2)形態変化を利用した分子アドレッシング(conformational addressing)

(1)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 をより大容量化するために、モデルの見直しを行い、データ部の片側のみにアドレス部を配置した従来のモデルを改良し、データ部の両端にアドレス部を配置したモデルを採用した。片側に 3 階層、両側で合計 6 階層のアドレス部を持ち、各階層につき 10 配列のアドレス部を持つ NPMM の作成(100 万アドレス)、及び、アドレッシングを行った。データを取り出す際には、片側 1 階層ずつ、両側で 2 階層分のアドレス指定が可能となり、6 階層分を 3 回の Nested PCR でアドレッシングを行うことになる。

作成においては、各階層ごとに目的とする長さの DNA が生成されているかを確認しながら、階層を増やして 6 階層 10 配列の NPMM の作成を行った。その際、100 万のアドレスの中で、ただ一つのアドレスに対応するデータとして、長さの異なる塩基配列を格納した NPMM を混合した。従って、アドレッシングの結果、電気泳動によって、長さの違うバンドが検出されれば、そのデータを区別することが可能となる。アドレッシングは、6 種類のアドレスについて行い、そのうち一つのアドレスは、長さの異なるデータを格納したものである。実験の結果から、アドレッシングが適切に行われていることを確認した。

また、大容量化の限界について考察するために、NPMM のアドレッシングの化学反応における種々の条件を考慮した最適化問題への定式化を行い、分析を行った。その結果、数 G クラスのアドレス空間が、現在の枠組みとしての限界であることがわかった。また、データの両側にアドレス部を持つモデルの方が、より容量を大きくできる可能性があることがわかった。

(2)萩谷グループと共同でヘアピン開裂を利用した conformational addressing に関する実験を継続して行った。4 連続ヘアピンについて、その調整法を改良することで今まで比べ大量のサンプルを得られるようになり、それを用いて引き続き動作確認実験を行った。電気泳動による動作確認で

は、オープン DNA 分子長を短くすることによる二次構造形成の抑制、反応温度を上げることで二次構造形成の抑制、反応率の向上が見られた。また、配列設計時に考慮した順序性・選択性を満たすかの確認実験を行い、どちらの性質も満たされていることを確認した。引き続き蛍光プローブによる動作確認を検討したが、4 連続ヘアピンの一部分が一本鎖になっている場合にその部分に相補な DNA が結合しうる能力はフリーな一本鎖の場合と比べ著しく低下していることが分かり、結合場所・順序が蛍光検出方法において重要な要素であることが分かった。

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、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、教授）
- ②研究項目：位置情報を利用した分子メモリと配列セットの設計・評価

「谷田」グループ

- ①研究分担グループ長：谷田 純（大阪大学、教授）
- ②研究項目：位置情報を利用した DNA メモリのための光 DNA 制御技術の開発

「大内」グループ

- ①研究分担グループ長：大内 東（北海道大学、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（原著論文）発表

- Masami Hagiya, Satsuki Yaegashi, and Keiichiro Takahashi: Computing with Hairpins and Secondary Structures of DNA, *Nanotechnology: Science and Computation*, Natural Computing Series, Springer, 2005, pp.293-308.
- Mitsuhiro Kubota and Masami Hagiya: Minimum Basin Algorithm: An Effective Analysis Technique for DNA Energy Landscapes, *DNA Computing: 10th International Workshop on DNA Computing, DNA10*, Lecture Notes in Computer Science, Vol.3384, 2005, pp.202-214.
- Keiichiro Takahashi, Satsuki Yaegashi, Hiroyuki Asanuma and Masami Hagiya: Photo- and Thermoregulation of DNA Nanomachines, *DNA11, Eleventh International Meeting on DNA*

Based Computers, Preliminary Proceedings, 2005, pp.147–156.

- Keiichiro Takahashi, Satsuki Yaegashi, Atsushi Kameda and Masami Hagiya: Chain Reaction Systems Based on Loop Dissociation of DNA, *DNA11, Eleventh International Meeting on DNA Based Computers, Preliminary Proceedings*, 2005, pp.343–353.
- Ken Komiya, Kensaku Sakamoto, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto, Azuma Ohuchi, Daisuke Kiga, Shigeyuki Yokoyama and Masami Hagiya: DNA polymerase programmed with a hairpin DNA incorporates a multiple-instruction architecture into molecular computing, *BioSystems*, Vol.83, No.1, 2006, pp.18–25.
- Y. Ogura, T. Beppu, M. Takinoue, A. Suyama and J. Tanida: Control of DNA molecules on a microscopic bead using optical techniques for photonic DNA memory, Preliminary proceedings of DNA 11, A. Carbone, M. Daley, L. Kari, I. McQuillan and N. Pierce, Eds., 2005, pp. 78–88 .
- M. Takinoue, Y. Hatano, Y. Endoh and A. Suyama: Amorphous DNA memory constructed with hairpin DNA immobilized on a solid surface, Preliminary proceedings of DNA 11, A. Carbone, M. Daley, L. Kari, I. McQuillan and N. Pierce, Eds., 2005, p. 410.
- M. Tagawa, D. Kiga, T. Yoshinobu, H. Iwasaki, and A. Suyama: Programmable step-by-step assembly of DNA nanostructures, *Foundations of Nanoscience 2005 — Self-Assembled Architectures and Devices*, John Reif, Ed., 2005, p.192, Science Technica
- J. Suzuki, T. Yoshinobu, W.-C. Moon, K. Shanmugam and H. Iwasaki: Micropatterning of Si Surface with Protein Molecules by the AFM Anodic Oxidation Method, *Electrochemistry*, 74, 2006, 131–134.
- F. Sumiyama, Y. Ogura and J. Tanida, “Observation of a stacking process of microparticles with multiple beams,” *Applied Optics*, Vol.44, 2005., pp.3271–3275.
- 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,” *Lecture Notes in Computer Science*, Vol. 3384, 2005, pp. 258 – 267.
- Y. Ogura, K. Watanabe, and J. Tanida, “Parallel Translation of microscopic objects in three-dimensional traps by sequential change of emitting vertical-cavity surface-emitting lasers,” *Japanese Journal of Applied Physics* (in print).
- 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*, 2005, pp. 366–375.