

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23550197

研究課題名(和文) DNAの精密分子認識能を用いた論理演算システム

研究課題名(英文) Construction of a logic gate system based on precision molecular recognition of DNA

研究代表者

野島 高彦 (NOJIMA, Takahiko)

北里大学・一般教育部・准教授

研究者番号：00291930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：PCRにおけるプライマーの添加を化学的な入力信号に、鋳型DNAの増幅反応の有無を出力信号に見立てたDNAに基づく論理演算システムの構築に取り組んだ。鋳型DNA内の増幅領域には緑色蛍光蛋白質(GFP)の遺伝子をコードしておくことにより、無細胞蛋白質合成系を用いて翻訳反応を行わせた結果を蛍光で確認することができる構成とした。プライマーおよび鋳型DNA内のプライマー会合領域の配列を適切に設計し、さらにプライマーと相補的に会合する一本鎖DNAを組み合わせることによって、種々のタイプの論理演算を可能とした。

研究成果の概要(英文)：Several PCR-based molecular logic gates were constructed. The logic gate was a PCR reaction mixture containing a linear DNA template (logic gate template) coding a green fluorescent protein (GFP) and a single stranded short DNA that hybridizes with the logic gate template (pre-mixed primer). Since the logic gate templates carry recognition sequences for transcriptional and translational machinery, the amplified GFP-coding sequence is translated to GFP in a coupled cell-free transcription-translation system, wired to the logic gates as a REPORT gate, that is, the output from the PCR-based logic gate is reported by green fluorescence. In this study, some PCR-based logic gates were designed to expand the variations in the logic operation pattern. Each gates designed and constructed on the study functioned properly.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：DNA PCR 論理ゲート GFP 無細胞翻訳系

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは1997年、マイクロ空間(体積 1/4 マイクロリットル)内における無細胞蛋白質合成に世界で初めて成功した(Fujii, Nojima et al., Proc. microTAS 1997)。そして、液体ハンドリングが困難な微小空間においても、mRNA に記録された遺伝情報に基づいた蛋白質合成が可能であることを示した(Nojima et al., Bioprocess Eng. 2000)。さらに、こうした手法で合成された蛋白質が酵素機能を有するものであることを、緑色蛍光蛋白質(GFP)の発現とその蛍光測定を用いて実証してきた(Yamamoto, Nojima et al., Lab Chip 2002; Anal. Sci. 2008)。

無細胞蛋白質合成反応は、DNA に記録された遺伝情報を、蛋白質という物質に変換する情報-物質変換プロセスである。そのため、この反応とマイクロ構造体との組み合わせは、半導体を用いないソフトな情報処理システムを開発する上でも、また、水溶液を用いる環境負荷の少ない分子情報システムを開発する上でも、非常に興味をもたれるアプローチである。研究代表者らの報告に続くかたちで、マイクロ空間内において無細胞蛋白質合成反応を行った研究が報告されはじめ、現在では研究代表者らが最初に用いた GFP の無細胞合成反応は、マイクロ反応におけるスタンダードな反応系となっている。

一方、無細胞蛋白質合成反応を行うために必要となる鋳型 DNA の調製には、バクテリアなどの生細胞を用いる目的 DNA 選別操作を必要とする。この操作は組み換え DNA 実験施設において行われなければならないものであり、このことが生命科学分野以外の研究者が、遺伝情報発現系を研究に採り入れる際の障壁となってきた。そこで研究代表者らは、遺伝子操作から蛋白質発現までの一連の遺伝子工学的操作を、生細胞を用いることなく化学的に進める実験手法の開発にも取り組み、その第一段階として、DNA 断片の連結反応を行った後の混合物中から、望ましい構成の DNA 分子のみを取り出す手法を開発した。この手法においては、マイクロキャピラリー電気泳動チップを用いた DNA 選別と DNA 増幅反応の組み合わせを用いており、これによって初めて、バイオハザード施設を用いることなく遺伝子工学的操作を行うことが可能となった(Nojima et al., Chem. Lett. 2007)。

以上の研究成果の統合を目指し、研究代表者は2008年度から2010年度まで、科学研究費基盤研究(C)の研究代表者として、「プロテオミクス基盤技術としてのオンチップ無細胞遺伝子工学創成」に取り組んだ。この研究に関する一つの成果として、透明プラスチックで構築された体積 10 マイクロリットルの微小空間内における無細胞蛋白質合成反応の結果を、GFP 蛍光の有無で並列的にレポートする、論理判断チップを開発することに成功した(Nojima et al., Chem. Comm. 2008)。

ここでは GFP をコードした鋳型 DNA に対して、プライマー会合領域の配列設計を行うとともに、プライマーと競争会合するオリゴ DNA を反応系に加えておく手法を開発した。

## 2. 研究の目的

以上の研究成果に基づいて、本申請課題においては、DNA 増幅反応および無細胞蛋白質合成反応を、単なる遺伝情報発現システムとしてではなく、化学的入力にตอบสนองして on/off 判断を示すインテリジェントな論理演算システムとしてとらえ、水溶液中における生体高分子ベースの論理演算分子システムに進化させることを目標とした。そして、複合的な論理判断を1ステップで実現する分子システムの開発を目的とした。

研究課題申請時においても現在においても、様々な分子を論理素子として用いる試みが進められている。研究方法としては、(i)低分子化合物を用いて、シンプルなメカニズムで限られたパターンの論理演算を行わせる、(ii)DNA の会合と解離や、酸化還元酵素の触媒活性を組み合わせ、多段階の反応を実行させることによって論理判断のバリエーション展開を目指す、の流れに大別される。

(i)の場合は、蛍光色素とキレート部位とを合わせ持つ低分子化合物に対して、光照射と金属イオン添加の2種類の操作を入力信号とみなす手法が代表的な例となっている。両者の入力信号が on であった場合に限り、分子のもつ蛍光特性が変化し、正の出力とみなされる。シンプルなくみをもつことが利点であるが、同一分子を用いて AND, NOT, OR といった基本論理演算を行わせた例は報告されておらず、それゆえに NAND や XOR といった複合演算を行わせることは困難である。

(ii)の場合には蛍光色素であらかじめ標識しておいた一本鎖 DNA 分子が、DNA チップ上の相補的 DNA 分子に会合する際、蛍光信号がチップ上で観測されるようになる仕組みを利用するものなどが知られている。DNA が可逆的に会合と解離を繰り返す能力をもつことを利用し、多段階にわたる DNA ハンドリングによって、論理演算パターンのバリエーション展開が可能であることも報告されている。しかし、DNA の会合過程においては、本来の会合部位とは異なる部位においても二重鎖会合が生じてしまう可能性があり、この結果としてバックグラウンド信号をカットすることが難しくなる場合がある。

これらのアプローチと異なり、本研究課題においては、DNA 増幅反応そのものを出力信号とはみなさず、増幅された DNA に記録された情報の有無に論理判断を依存させる。これによってプライマー-DNA が鋳型 DNA 上の目的領域以外の箇所にも会合した場合であっても、ここから増幅された信号は一切出力されない機構となっているので、バックグラウンド信号は完全にカットされる。分子素

子を用いる論理ゲートの開発においては有意な信号強度をどのレベルに設定するかが問題となるが、本研究課題においてはこの問題を完全にクリアすることができる。このメリットを活かし、生体高分子を構成要素とする、化学的入力にตอบสนองして on/off 判断を示すインテリジェントな論理演算分子システムの開発に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

真核生物ゲノムの二倍体染色体機構にみられる情報分散システムを模倣し、論理判断機構の高度化に取り組んだ。

論理演算や情報処理を実行するシステムとして、生物が用いている遺伝情報記録システムおよび発現システムにヒントを見だし、模倣して行くことによって、生体高分子を構成要素とする分子システムを構築・高度化して行く戦略をとった。このシステムの概念を図1に示す。

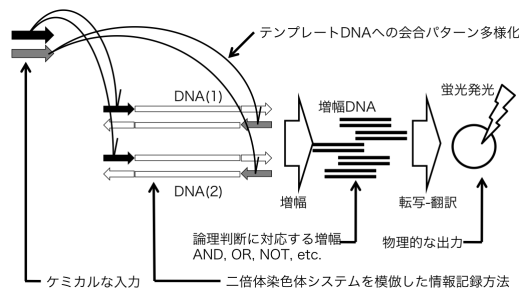


図1 真核生物ゲノムの二倍体染色体機構にみられる情報分散システムを模倣した論理判断機構の概念図。DNA(1)とDNA(2)とは同一遺伝子をコードしているが、遺伝子上流および下流に設けられているプライマーDNA会合領域の配列は異なる。反応系に入力されるプライマーDNAの組み合わせを変えることによって、DNA(1)のみ、DNA(2)のみ、DNA(1)とDNA(2)の両者からの増幅反応のいずれかを誘起することができる。増幅反応に続いて無細胞蛋白質合成系によるGFP合成反応が行われ、その結果は蛍光発光の有無によって確認することができる。プライマーDNAをあらかじめ反応系に共存させておき、これらのプライマーDNAと会合する配列を持った一本鎖DNAを入力信号とすれば、デフォルトで反応を進行させておく系を構築することもできる。

### 4. 研究成果

(1) 万能論理演算ゲートである NAND タイプの論理演算を行う分子システムの開発

図2に示す分子システムを設計し、NAND タイプの論理演算を行わせた。ここでは図1に示したDNA(1)とDNA(2)に対応する、鎖長1 kbpの2種類のDNAを組み合わせ、これらの増幅反応に必要なプライマーDNAを2種類共存させておく状態を初期状態とし、ここにこれら2種類のプライマーと相補的な配列をもつ一本鎖DNAを1種類もしくは2種類与えることによって増幅反応を停止さ

せ、その結果がGFP合成後の蛍光として確認できる構成とした。

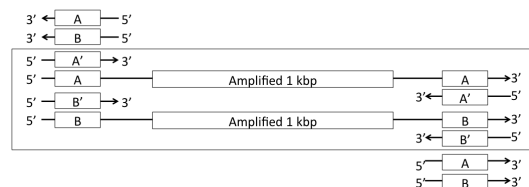


図2 NANDタイプの論理演算を行うDNA分子システム。反応系にはあらかじめ2種類の鋳型DNAが存在しており、それらは互いに共通した遺伝子を持つが、増幅反応を開始するために必要なプライマーDNA会合領域の配列は異なっている。いずれの鋳型DNAも、遺伝子を挟み込む2箇所のプライマーDNA会合領域配列は共通となっており、1種類のプライマーだけで増幅反応が進行する。NANDタイプの論理演算においては入力信号が0の場合に正の応答をする必要があるため、あらかじめ2種類のプライマーAおよびBを加えておき、入力信号としてこれらに対して相補的な配列を持つ一本鎖DNAのA'、B'、または両者の組み合わせを用いた。

NANDタイプの論理演算が示す演算出力を図3に示した。ここでは比較のためにANDタイプの演算出力も併記した。この結果から、ANDタイプと正反対の応答が示され、このパターンがNANDタイプであることが認められた。

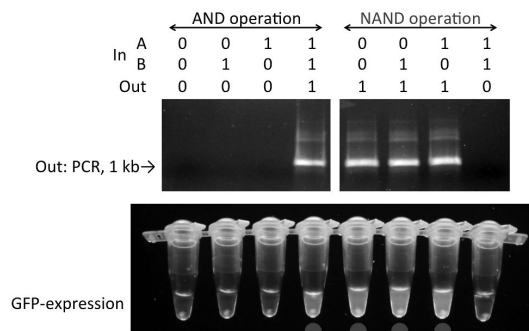


図3 NANDタイプの論理演算を行う分子システムの出力。左側半分が比較のために掲載したANDタイプの演算、右側半分が本研究課題で開発に取り組んだNANDタイプの演算。上段「AND operation」および「NAND operation」は0と1で入力と出力の関係を表したもので、中断はPCRにおけるDNA増幅が起きるか起きないかをアガロースゲル電気泳動で示したものである。「Out: PCR, 1 kb」の位置がターゲット配列の増幅産物に対応する。下段「GFP-expression」は増幅反応後の反応溶液を無細胞蛋白質合成系に混合した後に励起光照射を行った場合、を付した4チューブで有意に蛍光が認められる。

(2) 論理演算パターンのバリエーション展開の一例としてのNORタイプの論理演算を行

う DNA 分子システムの開発

図 4 に示す分子システムを設計し、NOR タイプの論理演算を行わせた。ここでは GFP をコードした鋳型 DNA は 1 種類だけ存在させておき、その上流と下流とに 2 種類のプライマー会合領域を設定した。2 種類のプライマーはあらかじめ反応溶液中に共存させておき、デフォルトで増幅反応が進行するしくみとした。ここに、これら 2 種類のプライマーに対して相補的な配列をもった一本鎖 DNA を与えると、増幅反応が阻害され、その結果として GFP の蛍光は観測されなくなる機構を設計した。

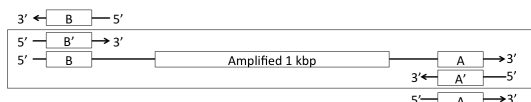


図 4 NOR タイプの論理演算を行う DNA 分子システム。初期状態で反応系には 1 種類の鋳型 DNA と、ここにコードされた鎖長 1 kbp の領域を増幅するために必要な 2 種類のプライマー A および B が共存している。ここにこれら 2 種類のプライマーと相補的配列をもつ一本鎖 DNA の A, B, もしくは両者を加えると、DNA 増幅反応は阻害され、無細胞蛋白質合成系における蛍光は観測されなくなる。

NOR タイプの論理演算が示す演算出力を図 5 に示した。ここでは比較のために OR タイプの演算出力も併記した。この結果から、OR タイプと正反対の応答が示され、このパターンが NOR タイプであることが認められた。

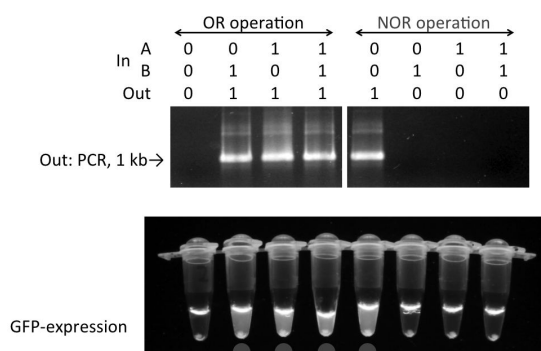


図 5 NOR タイプの論理演算を行う分子システムの出力。左側半分が比較のために掲載した OR タイプの演算、右側半分が本研究課題で開発に取り組んだ NOR タイプの演算。上段「OR operation」および「NOR operation」は 0 と 1 で入力と出力の関係を表したもの。中断は PCR における DNA 増幅が起きるか起きないかをアガロースゲル電気泳動で示したもの。「Out: PCR, 1 kb」の位置がターゲット配列の増幅産物に対応する。下段「GFP-expression」は増幅反応後の反応溶液を無細胞蛋白質合成系に混合した後に励起光照射を行った場合。を付した 4 チューブ

で有意に蛍光が認められる。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Takahiko Nojima, Shohei Kaneda, Hiroshi Kimura, Takatoki Yamamoto, Teruo Fujii, Application of cell-free expression of GFP for evaluation of microsystems, *Frontiers in Bioscience*, Vol. 17, January 2012, p 1931-1939, 査読有り。

DOI: 10.2741/4029

Shohei Kaneda, Koichi Ono, Tatsuhiro Fukuba, Takahiko Nojima, Takatoki Yamamoto, Teruo Fujii, Modification of the glass surface property in PDMS-glass hybrid microfluidic devices, *Analytical Sciences*, Vol. 28, No. 1, January 2012, p39-44, 査読有り。

DOI:10.2116/analsci.28.39

Shohei Kaneda, Koichi Ono, Tatsuhiro Fukuba, Takahiko Nojima, Takatoki Yamamoto, Teruo Fujii, A rapid method for optimizing running temperature of electrophoresis through repetitive on-chip CE operations, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 12, No. 7, July 2011, p 4271-4281, 査読有り。

DOI:10.3390/ijms12074271

〔学会発表〕(計 2 件)

Takahiko Nojima, Construction of a molecular logic gate inspired by polymerase chain reaction, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), ハワイ(アメリカ合衆国), 2015 年 12 月 15 日 -20 日。

野島 高彦, 山本 貴富喜, 木村 啓志, 藤井 輝夫, 蛍光蛋白質の生体外発現を演算レポーターに用いる DNA ロジックゲート, 日本化学会第 92 春季年会, 慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス(神奈川県横浜市), 2012 年 3 月 25 日-28 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕  
研究代表者のホームページ  
<http://www.takahiko.info/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野島 高彦 (NOJIMA, Takahiko)  
北里大学・一般教育部・准教授  
研究者番号：00291930

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

藤井 輝夫 (FUJII, Teruo)  
東京大学・生産技術研究所・教授  
研究者番号：30251474

山本 貴富喜 (YAMAMOTO, Takatoki)  
東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：20322688