

**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：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26540160

研究課題名(和文)人工細胞回路を用いたDNAコンピュータの創製

研究課題名(英文)Construction of DNA computer using artificial cell circuit

研究代表者

川野 竜司 (Kawano, Ryuji)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90401702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、マイクロ流体技術により人工細胞膜を持つ液滴をネットワーク化し、人工膜中に形成したチャネル膜タンパク質とDNAを用いて、電気により出力を検出可能なDNAコンピュータを構築することであった。微小液滴を用いて、液滴内でDNA演算を行い、液滴界面に形成させた脂質二分子膜中のナノポアで、出力のDNAを検出することで液滴ネットワークを用いた演算システムを構築できた。これらの成果を複数の学会で発表し、また査読付き論文、国際会議紀要に合わせて4報報告した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this project is the construction of DNA computing using artificial cell membrane with nanopore. As the result of two years struggling, we have integrated DNA computing system into the droplet networks in the microdevices. These results have been gave publicity to several conferences and academic journals.

研究分野：化学

キーワード：ナノポア DNA演算 マイクロデバイス

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜表面には、細胞内外の物質のやりとりを制御するチャンネルを持った膜タンパク質が多数存在する。イオンチャンネルの場合、細胞膜に電圧を印可し、チャンネルを流れる電流を観測するパッチクランプ法を用いた計測が一般的に行われている。

これまで申請者は、脂質二分子膜中に約 1.4 nm のナノポアを有す膜タンパク質 ( $\alpha$ -Hemolysin,  $\alpha$ HL) を再構成し、その電気シグナルの計測を行ってきた。例えば、ナノポアシーケンスに応用するため、DNA 一分子のチャンネル通過挙動を拡散係数や拡散の活性化エネルギーの算出から明らかにした (JACS 2010)。また DNA アプタマーがターゲット分子と三次元複合体を形成することから、コカインアプタマーを用い、その迅速検出を行った。コカインアプタマー形成前はチャンネル通過、形成後はチャンネルをブロックすることから、この変化をチャンネルシグナルとしてコカイン一分子を計測することに初めて成功した(図 1a, JACS 2011)。しかしながら、平面膜の形成は熟練した技術を要し、また一度形成した膜が容易に壊れるという問題があった。申請者は以前から膜の安定性を高めるためにナノ孔への膜形成などの検討(図 1b, Small 2010)を行った結果、最も簡単・安定な脂質膜形成法「液滴接触法」を見いだした。液滴接触法は脂質分子を分散させた有機溶媒中に水滴を滴下すると、液滴表面に自発的に形成される脂質単分子膜が形成する。この二つの液滴を互いに接触させることで、簡単かつ安定な脂質二分子膜が形成できる(図 1c, Sci. Rep. 2013)。最近この液滴接触法を用いて液滴ネットワークの研究が盛んになってきている。例えば Oxford 大の H. Bayley らは液滴ネットワーク中に、正電荷を有するアミノ酸残基を増やしイオン選択性を持たせた  $\alpha$ HL 変異体を再構成し、イオン輸率の差を利用したダイオードを作製した(Nat. Nanotech. 2009, 図 1d)。しかしながら、これまで本提案のように DNA とチャンネル膜タンパク質を

組み合わせて論理演算素子を構築する研究は行われておらず、全く新しい視点からの研究が展開できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロ流体技術により人工細胞膜を持つ液滴をネットワーク化し、人工膜中に形成したチャンネル膜タンパク質と DNA を用いて、電気により出力を検出可能な DNA コンピュータを構築する。これまでの予備実験により本システムにより NAND 演算等の論理演算が出来ることが実証できた。本研究では DNA の酵素反応の導入により高度な DNA コンピューティングを行うことを目指す。これまで DNA コンピューティングをチャンネル膜タンパク質のシグナル情報として行った例は皆無であり非常に挑戦的な研究課題である。本研究課題では、ナノサイズのチャンネルを有する膜タンパク質である alpha-hemolysin ( $\alpha$ HL、ナノポア直径 1.4 nm)のチャンネルを、single-strand DNA (直径~1 nm)は通過できるが、double-strand DNA(直径~2 nm)は通過できない二通りの減少を二進数の 1 と 0 に対応することにより論理演算を構築できることを提案する。これを MEMS 技術を基盤とした人工細胞膜回路を

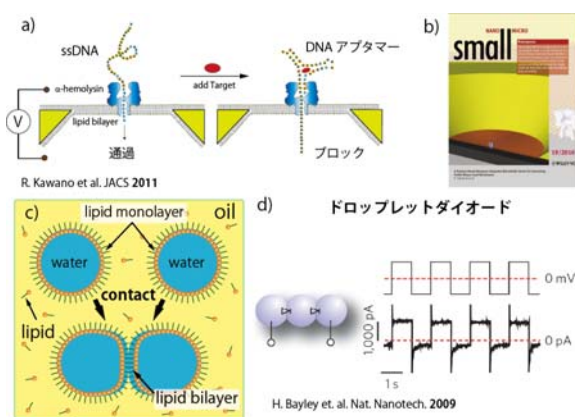


図 1 これまでの研究背景。a)DNA アプタマーとチャンネルタンパク質を用いて一分子コカインの電气的検出に成功。b)人工脂質膜をサブナノ孔に形成させることにより安定性を向上。c)液滴接触法により簡単で安定な人工膜を形成可能になった。d)Bayley らは変異体チャンネルを用いたドロップレットダイオードを実証した。

マイクロデバイスで行う。これまで DNA コンピューティングの情報出力は、DNA に結合した蛍光分子を用いた光学的手法により行っており、本系のような分子輸送と電気応答が共役した情報の取り出しは新規性が高い。また蛍光による演算出力よりも本系のほうが、分子がチャンネルを通過する時間(~ms)で出力を行うので演算出力時間が速くなると予想できる。

### 3. 研究の方法

生体内での細胞間の情報伝達は、多種多様な目的のために行われているが未解明の部分が多く、人工系で実用的に利用可能な機能を付与するのは難しい。そこで本研究では、これまで行ってきた DNA アプタマーの研究を基盤に、DNA コンピューティングの手法と組み合わせることにより、論理演算可能な人工細胞回路の実現を試みる。またこの素子では論理演算を DNA が行い、演算の結果をチャンネル膜タンパク質の電流の形で取り出すことが可能なことから、一般的な電気回路との親和性が高いことも大きな利点である。本研究では、液滴ネットワークを用い、DNA の相補的結合を利用し NAND 回路の作製を行う。NAND 回路は論理回路の一種で、論理演算に用いられる AND、OR、NOT すべての演算を表現することが可能なことから、NAND 回路を造ることができれば、その組み合わせですべての論理演算が可能となる。

これまでの予備実験により、二つの液滴を用いたマイクロデバイスでは、ssDNA が $\alpha$ HL チャンネルを通過する場合、dsDNA を形成してチャンネル通過をしない場合の二つの事象を二進法の入力とすることで、NAND 演算が可能になることが分かってきた。本提案ではこのシステムでより高次のコンピューティングを行うために、以下の二つの課題について検討する。現状では膜タンパク質が DNA 分子を知覚した結果、出力を分子・電気の二系統で取り出すことができるが、取り出した分子を次の反応に使うことができない。課題 1 ではネットワーク化、課題 2 では酵素反応を

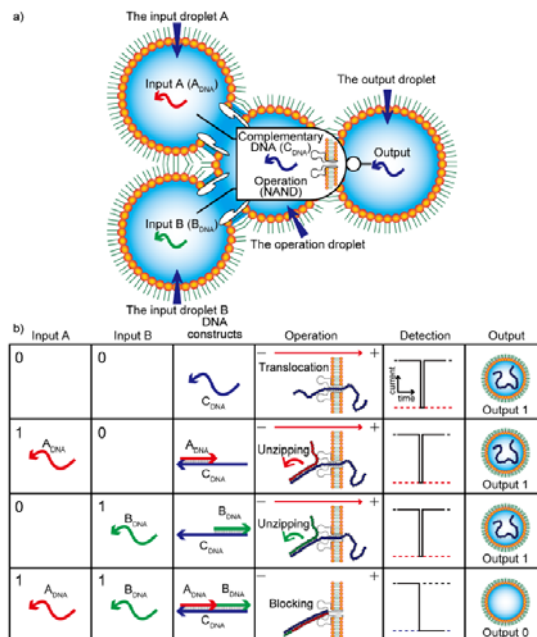


図 2 4 つの液滴を接続したドロップレットネットワークの構築。設計した DNA を用い、NAND 回路の作製に成功。ナノポアで出力 DNA を検出できた。

用いることでこれを解決する。

1. 脂質液滴ネットワーク (4 wells) を用いた論理演算の実証
2. 酵素反応を導入した多段階計算システムの確立

### 4. 研究の成果

以下に、2 つの課題に関して得られた成果について述べる。

#### 課題 1. 脂質液滴ネットワーク (4 droplets) を用いた論理演算の実証

システムの原理を詳細に述べる。はじめに演算用の DNA を設計した (以降図 2 を参照)。短鎖の DNA(A)、DNA(B)は、長鎖の DNA(C)の 3'および 5'末端と相補鎖を作るように熱力学シミュレーションを用い配列設計を行った。4 つのドロップレットそれぞれの液滴間は脂質二分子膜で仕切られており、脂質膜中に再構成された $\alpha$ HL チャンネルにより電氣的に接続されている。4 つの液滴のうち、2 つを Input 液滴、一つを塩山駅敵、最後の一つを出力液滴と設定しデバイスを作製した。Input A, B の液滴から output の液滴まで電位勾配を形成させておき、あらかじめ真ん中の

演算液滴には DNA(C)を入れておき、真ん中の液滴と output の液滴の間のチャンネルシグナルを観測する。入力(0,0)の時は真ん中に入っている DNA(C)が出力(1)し、(0,1),(1,0)の時は片側に相補鎖を作った DNA が開列し出力(1)を出す。(1,1)の場合は DNA が完全な相補鎖を作りポアを通過せず出力(0)を出力する。本系では出力(1), (0)を DNA がシングルストランドの状態では  $\alpha$ HL チャンネルを通過するか、ダブルストランド構造を作ってチャンネルに詰まるかで行った。このとき、DNA の配列、塩基の長さ、印加電圧のバランスにより、相補鎖を形成したときの結合の強さ、チャンネル内での開列のしやすさが変化する。上記の条件を最適化した結果、本原理を用いてマイクロ加工により作製した 4 つの液滴ネットワークシステムにおいて、NAND 演算がおおよそ 30 程度の短時間で出来ることがわかった。

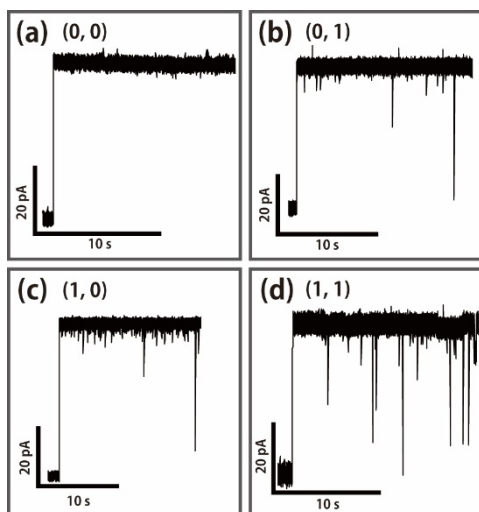


図3 酵素反応により増幅された出力 RNA のナノポア計測。AND 条件を満たすシステムの構築に成功した。

## 課題 2. 酵素反応を導入した多段階計算システムの確立

これまでのシステムでは多段階の計算において出力された DNA の濃度が低下してしまう問題があった。今回、我々は DNA と RNA 合成酵素を用い低濃度の DNA を入力とし、酵素反応により出力となる RNA を検出可能な濃度まで増幅できるシステムの構築を目的とする。さらに、このシステムを用いた応

用例として AND ゲートの構築を試みた。

各入力 DNA が Input 液滴に存在する時を入力 1、存在しない時を入力 0 とし、ナノポアを分子が通過し Output 液滴に移動すると出力 1、通過をしないと出力 0 と定義した。二つの入力 DNA が同時に存在する時のみ RNA 合成酵素が DNA を認識し、酵素反応により RNA が合成・増幅され電流阻害の頻度が上昇するように演算用 DNA を設計した。その結果、2 つの入力 DNA が存在する場合、スパイク状の電流阻害が見られた(図 3d)。入力 DNA が存在しない場合、電流阻害はほぼ見られなかった(図 3a, 3b, 3c)。RNA が単位時間あたりにナノポアを通過する電流阻害頻度から出力 0 と 1 を分ける閾値の設定により、適切な出力を得ることができ、また従来の半分の時間で検出することができた。本結果から迅速に出力を検出可能な論理演算回路を構築することができた。

## 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 4 件)

【原著論文】(査読付き)

- ① M. Ohara, Y. Sekiya, R. Kawano, “Hairpin DNA Unzipping Analysis Using a Biological Nanopore Array” *Electrochemistry* **2016**, 84, 338-341.
- ② † H. Yasuga, † R. Kawano, M. Takinoue, T. Tsuji, T. Osaki, K. Kamiya, N. Miki, S. Takeuchi (†equal contribution) “Logic Gate Operation by DNA Translocation through Biological Nanopores” *PLoS ONE*, **2016**, 11(2): e0149667.

【国際学会紀要】(査読付き)

- ① M. Ohara and R. Kawano “Logic Gate Operation using Three-way Junction DNA and Biological Nanopore” *Proceedings of MicroTAS 2015*, 1493-1495.
- ② M. Ohara, M. Takinoue and R. Kawano, “DNA/RNA Computing with Biological Nanopore in Droplets System: AND Operation Using RNA Polymerization” *Proceedings of MicroTAS 2014*, 1790-1792.

〔学会発表〕(計5件)

- ① 大原正行、瀧ノ上正浩、川野竜司 「人工細胞膜を用いた DNA/RNA 論理演算回路の構築」第5回 CSJ 化学フェスタ 2015年10月13日～15日、タワーホール船堀(千葉)
- ② M. Ohara, and R. Kawano “Logic Gate Operation using Three-way Junction DNA and Biological Nanopore”, Micro TAS 2015, October 25-29, 2015 Gyeongju, Korea.
- ③ R. Kawano “Construction of DNA/RNA logic gates with biological nanopores” 細胞を作る会 7.0 (招待講演), 2014年11月13日～2014年11月14日, 東京大学(東京都文京区).
- ④ M. Ohara, M. Takinoue and R. Kawano “DNA/RNA Computing with Biological Nanopore in Droplets System: AND Operation Using RNA Polymerization”, Micro TAS 2014, October 26-30, 2014 Texas, USA.
- ⑤ 大原正行、瀧ノ上正浩、川野竜司 「 $\alpha$ -hemolysin 及び T7 RNA polymerase を用いた DNA/RNA ロジックゲートの実現」第52回日本生物物理学会年会 2014年09月25日～2014年09月27日、札幌コンベンションセンター(北海道)

〔図書〕(計1件)

- ① 川野 竜司 “ドロップレット型人工細胞膜によるチャネル膜タンパク質計測”, *生物物理*, **2015**, Vol. 55 No. 2, 51 (pp. 77-80).

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

川野 竜司 (KAWANO, Ryuji)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 90401702

(2)研究分担者

瀧ノ上 正浩 (TAKINOUE, Masahiro)

東京工業大学・大学院情報理工学院・准教授

授

研究者番号: 20511249