

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300100
 研究課題名(和文) DWPCR を用いた高性能試験管内遺伝的プログラミングによるタンパク質の創製
 研究課題名(英文) Displacement WPCR for protein evolution via high efficiency *in vitro* genetic programming

研究代表者
 ローズ ジョン アンソニー (ROSE John Anthony)
 立命館アジア太平洋大学・アジア太平洋学部・准教授
 研究者番号：00345125

研究成果の概要：本研究では、Displacement WPCR (DWPCR) を実験により実証し、Whiplash PCR の等温・高効率プラットフォームとして確立した。主な実績には以下が含まれる：(1) ルールプロテクト・バイオステップによるバックハイブリダイゼーション排除効果の実証、(2) マルチステップ DWPCR の実行および最適化、(3) ルールスイッチ・バイオステップ実行のためのルールプロテクトの使用 これにより DWPCR ミクスチャーの外部制御が可能となり、二次的生物学的・計算プロセスとの直接的統合への道が開かれる、(4) DWPCR クロスオーバー (Evolutionary WPCR の基本演算) の基本的実行可能性の実証。その他、Taqman プローブとリアルタイム PCR に基づく改良 DNA 読み出し法の開発、また DNA システムをシミュレーションし、ハイファイ DNA コード化を進化させる NucleicPark ソフトウェアツールの改良も実績に含まれる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2007 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：DNA Computing, Genetic Program, Whiplash PCR, Displacement Whiplash PCR, Crossover, TAT System, Hybridization Error, Readout method

1. 研究開始当初の背景

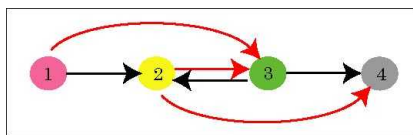
Whiplash PCR (WPCR) では、DNA ヘアピンミクスチャーの自己触媒的なポリメラーゼ伸長によって自律計算が実行される。WPCR は有望であるが、深刻な自己阻害形態であるバックハイブリダイゼーション (BH) という問題が伴う。BH によって伸長効率がおよそ 10^5 (1 回のポリメラーゼ衝突あたりの伸長回数) にまで減少する。したがって、これまでの研究は、PNA2/DNA 三重鎖形成により BH を減少させる改良アーキテクチャーである PWPCR の開

発に焦点が置かれてきた。残念ながら、PWPCR の効率も低く (10^2 伸長/衝突) 生物学への応用にも限界があり (たとえば、XWPCR のよるタンパク質設計 (WPCR ワード間で標的配列が重合するため)) また高温操作が必要なために実際の問題が生じてしまう。これに対して我々は、WPCR の改良バージョンである Displacement WPCR (DWPCR) を提案した。この方法は標的プライマー置換 (ルールプロテクト) により BH を排除するものだ。このアーキテクチャーは、ほぼ一貫した計算効率を

(5) DWPCR ベース EWPCR :

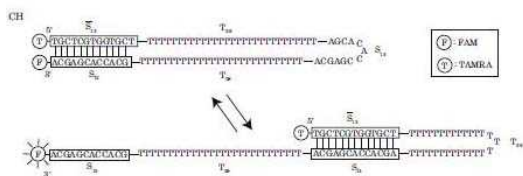
EWPCR の実行可能性の実験的検証には 3 点が関係する : (i) splinting 鎖あるいはプライマーが一本鎖 DNA DWPCR 断片のライゲーションをその後のルールブロック演算を阻害することなく促進する能力、(ii) 効率的複合エンドヌクレアーゼ消化および二次ライゲーションを支援する最適条件の特定、(iii) コンピナトリアルにシャッフルされた鎖のプールから標的娘鎖を分離する能力。(i) を検証するため、2 鎖 DWPCR ベース EWPCR システムを設計した。そして、“疑似”1 点クロスオーバーを、Hind III 制限部位で 3' リン酸化プライマーとの splinted ライゲーション (必要な最適化)、T4 DNA リガーゼとのライゲーション、2 ステップ DWPCR により実行した。

(ii) と (iii) を検証するため、2 つ目のモデル (4 ステート、3 ステップ) EWPCR システムを設計した (以下に、計算できない 3 ステップ経路をコードする 2DWPCR 鎖を示す (赤と黒の矢印): 2 点クロスオーバーが有効経路 1 2 3 4 を辿るよう、DWPCR 鎖 (DNA 符号は示さない) を設計した) として、Hind III によるダブルプライマー依存性消化、T4 DNA リガーゼとのライゲーション、DWPCR、PAGE 視覚化による 2 点クロスオーバーを実行した。



(6) 競合的ヘアピンシステム :

ヘアピンベース DNA システム予測の統計熱力学モデルの実験的検証を継続するため、スペーサー長が FRET 効率に与える影響を考慮した改良を含め、競合的ヘアピンシステム (FRET 途絶時の蛍光強度増加による準最適的ヘアピン構造の占有を観察する) の詳細理論分析を実施し、改良 FRET システムを設計、採用した。追加実験として、DNA ベースシステムの構造変異の量的観察に関する一般的问题を克服するため、FRET ではなくコンタクト・クエンチングに基づく新しいフルオロフォア観察法も検証した。



(7) エラーハイブリダイゼーションのモデル化 :

DNA システムの挙動を予測するため、そしてカスタム DNA 符号語設計を支援するために、

理論モデルおよびソフトウェアツールの開発は DNA 計算にとって非常に重要となる。計算的一貫性に基づく DNA ハイブリダイゼーションエラーモデルに関する検証は、希薄・過剰入力条件下で TAT システムエラーを予測する理論モデルの拡張、そして NucleicPark ソフトウェアに支援される DNA システムセットに重点を置いて継続された。

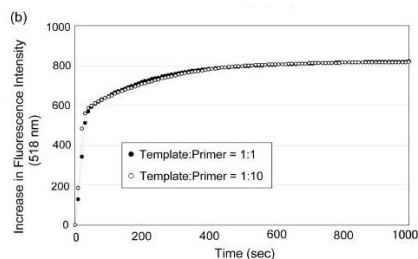
(8) DNA 計算読み出し

WPCR を含む DNA 計算結果を自動的に読み出すためのリアルタイム PCR を応用した改良 Taqman プローブ法を、Opticon Lightcycler 上で実験的に実行および最適化する目的で、マレーシア工科大学 (Z. Ibrahim) と共同で開発、最適化した。本法の評価はモデルスケール HPP 例への実験的応用により行った。結果をコンピュータ処理するアルゴリズムも検証した。

4. 研究成果

(1) DWPCR - 定方向置換 :

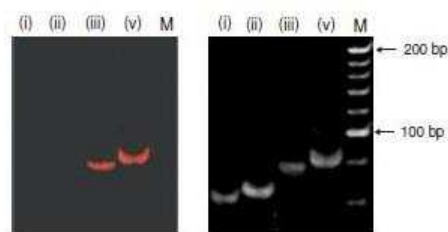
プライマー依存性ポリメラーゼ伸長による効率的・迅速ヘアピンループ開口の実行可能



性を、ヘアピン開口に伴う蛍光の増加 (以上に示す) の直接的観察、そして重合時間系列の生成物の PAGE 視覚化 (データは示さない) により実験検証した。これらの実験の成功は DWPCR アーキテクチャーにとって非常に重要であった。

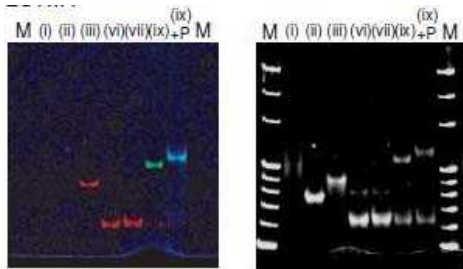
(2) ルールプロテクト :

バックハイブリダイゼーションを完全に排除するための新ルールプロテクト演算使用の基本的実行可能性を、反応結果および予想産物の PAGE 視覚化により実験検証した。結果を以下に示す : 左は未染色ゲル (非伸長/伸長プライマー-R1 を視覚化) 右は染色ゲル (全 DNA を視覚化)。



(3) マルチステップ DWPCR :

等温条件下で効率的マルチステップ DWPCR を行うルールプロテクトの実行可能性を、各プライマー伸長後に反応産物を PAGE で視覚化することにより実験的に確認した。これは

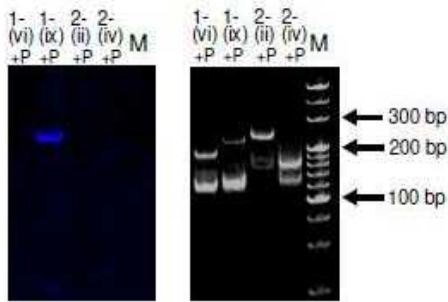


DNA 計算にとっての大きな前進である。

最適化の結果 : (1) Bst DNA ポリメラーゼのみが二本鎖 DNA 産物への最終変換能を有していたことから、これが DWPCR を実行するための唯一の最適ポリメラーゼであるとおもわれた (結果は示さない); (2) アデニンの計画外 3' 追加による効率低下を防ぐため、5' 末端停止配列の存在が必要であることがわかった (結果は示さない)。

(4) ルールスイッチ :

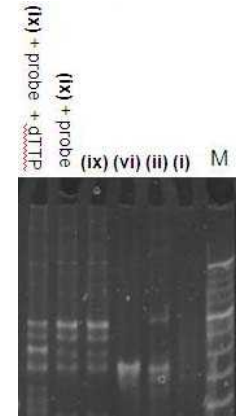
外部ルールスイッチングを行うためにルールプロテクトを使用する実行可能性を、2 回目の DWPCR 伸長前のポリメラーゼおよびプライマー-R2-1 の追加、そして続く産物の PAGE 視覚化により実験確認した (データを以下に示す)。



この重要な技術革新により個々の DWPCR 鎖の外部制御が実行され、DWPCR に更なるプログラミング性が追加されてその能力が大きく拡張される。追加される能力は : (i) 非決定性 Whiplash PCR、(ii) 代替計算経路の選択による外部制御可能なマルチパス WPCR 演算、(iii) Response WPCR (DWPCR 演算が外部生物学的プロセスにより生成されるプライマーにより調節される) (iv) レポーター鎖 (結合・伸長して他の DWPCR 種の演算を制御する) の置換による DWPCR 鎖間のプライマー介在コミュニケーション

(5) DWPCR ベース Evolutionary WPCR : EWPCR 実験の第 1 ラウンドでは、プライマー依存性 DWPCR クロスオーバーの基本的実行可能性を確認した。これは模擬 1 点シャフリング実験 1 ステップ DWPCR 親鎖 2 本の splint

依存性ライゲーション (消化は省略) を Hind III 制限部位で実行し、これにより有効な 2 ステップ計算をコードする viable 娘鎖が生成され、続いて 2 ステップ計算が実施される。確認された。EWPCR 実験の第 2 ラウンドでは、PAGE ではっきりとしてバンド



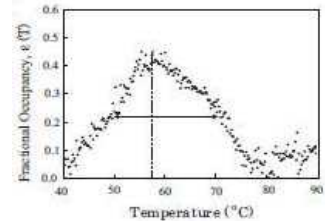
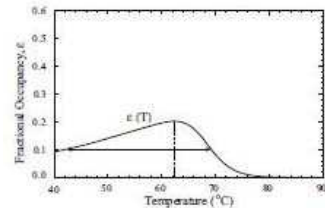
ドが確認できなかったため以下のことが示唆される : (i) DWPCR シャフリングを実行する目的での標準 Hind III および T4 DNA リガーゼコンディションの不適切さ、(ii) 最適な同時反応プロトコルを特定する最適化研究の必要性、(iii) PAGE 前の EWPCR 増幅後プロセス、あるいは代替生成物検出法 (たとえば、リアルタイム PCR) の採用の必要性。

(6) 競合的ヘアピンシステム :

FRET 実験の結果 (図 : 上) はシステムの準最適標的ヘアピンの占有の理論的予測 (図 : 下) とよく一致しており、特徴的な “丘陵型” を

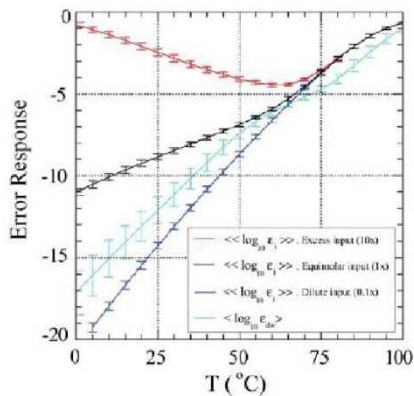
形成し、最大標的ヘアピン占有の温度もよく一致していた。これは、最適および準最適構造の占有を量的に予測する結合統計熱力学モデルの応用が決定的かつ再現可能な形で確認されたことを意味する。

しかし、実験の第 2 ラウンド FRET ではなくコンタクト・クエンチングによる改変実験システムを採用してヘアピン形成を観察した。では再現可能な結果は得られず、今後の更なる実験の必要性が示唆された。



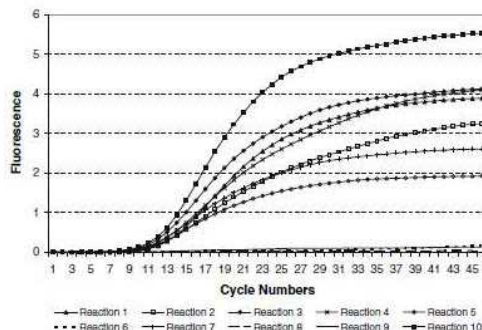
(7) DNA ハイブリダイゼーションエラー : NucleicPark を更新、拡張し、.NET プラット

ホーム (C#) に移動した。プライマーハイブリダイゼーション、DNA チップ上の DWPCR 鎖固定 (たとえば TAT システム) におけるエラープロセス、Adelman アルゴリズムのエラープロセスのシミュレーションのほか、DWPCR、TAT、その他の DNA システムの優れた DNA コード化の設計に使用できるツールが開発されている。TAT システム解析に焦点を当てたウェブベース版が公開され、現在使用可能となっている。モデルに関する理論的結果、そしてそのハイファイ TAT システムコード化のコンピュータ解析および進化への応用が IEEE TNB で発表されている (シミュレーション例を以下に示す)。Faculty of 1000 Biology はこの研究 これは DWAPCR 鎖の固定のモデリングだけでなく、DNA マイクロアレイの解析および設計にとって非常に重要な技術的進歩として選定している。



(8) リアルタイム PCR 出力 :

改良法を Opticon Lightcycler 上で実行することに成功した。Taqman プローブ法は、Adelman アルゴリズムや Whiplash PCR を含め、DNA 計算プロセスに幅広く応用できる (結果を以下に示す)。改良法は既存法との比較で結果が優れていた。“yes” と “no” を区別するコンピュータアルゴリズムも開発され、その有効性も確認された。



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 8 件)

(* はコレスポンディングオーサー)

K. Komiya, M. Yamamura, and J. Rose*, 'Experimental Validation and Optimization of Signal Dependent Operation in Whiplash PCR', *Int'l Journal of Natural Computing, in press* (2009). 査読有

K. Komiya, M. Yamamura, and J. Rose*, 'Experimental Validation and of Signal Dependent Operation in Whiplash PCR', *Springer Verlag LNCS, Vol. 5347, 1-10* (2009). 査読有

Z. Ibrahim, J. Rose, A. Suyama, and M. Khalid, 'Experimental Implementation and Analysis of a DNA Computing Readout Method based on Real-Time PCR with TaqMan Probes', *Int'l Journal of Natural Computing, 7, 277-286* (2008). 査読有

J. Rose*, R. J. Deaton, M. Hagiya, A. Suyama, 'A Coupled Equilibrium Model for Hybridization Error Estimation for the DNA Microarray and Tag-Antitag Systems', *IEEE Transactions in NanoBioscience, 6(1) 18-27* (2007). 査読有

Z. Ibrahim*, M. Saaid, A. S. Parmita, A. Suyama, and J. Rose, 'An Improved Readout Method for Molecular Computation based on Real-Time PCR Implemented on DNA Engine Opticon 2 System', *2007 IEEE Congress on Evolutionary Computation, Singapore, pp. 1829-34* (Wiley IEEE Press, 2007). 査読有

K. Komiya, S. Yaegashi, M. Hagiya, A. Suyama, and J. Rose*, 'Experimental Validation of the Statistical Thermodynamic Model for Prediction of the Behavior of Autonomous Molecular Computers Based on DNA Hairpin Formation', *DNA Computing, Springer Lecture Notes in Computer Science (LNCS Vol. 4287, 2006), pp. 428-438*. 査読有

J. Rose*, K. Komiya, S. Yaegashi, and M. Hagiya, 'Displacement Whiplash PCR: Optimized Architecture and Experimental Validation', *DNA Computing, Springer Lecture Notes in Computer Science (LNCS Vol. 4287, 2006), pp. 393-403*. 査読有

Z. Ibrahim*, J. Rose, Y. Tsuboi, O. Ono, and M. Khalid, 'A New Readout Approach in DNA Computing Based on Real-Time PCR with TaqMan Probes', DNA Computing, Springer Lecture Notes in Computer Science (LNCS Vol. 4287, 2006), pp. 350-359. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

Komiya, K., 'Experimental Validation and of Signal Dependent Operation in Whiplash PCR', Oral Presentation, 14th International Conference on DNA-based Computing, Prague, Czech Republic (June, 2008).

Komiya, K., 'Experimental Validation of the Statistical Thermodynamic Model for Prediction of the Behavior of Autonomous Molecular Computers Based on DNA Hairpin Formation', Poster Presentation, 12th International Conference on DNA-based Computing, Seoul Korea (June, 2006).

Komiya, K., 'Displacement Whiplash PCR: Optimized Architecture and Experimental Validation', Poster Presentation, 12th International Conference on DNA-based Computing, Seoul Korea (June, 2006).

6. 研究組織

(1)研究代表者

ローズ ジョン アンソニー (ROSE JOHN ANTHONY)

立命館アジア太平洋大学・アジア太平洋学部
・准教授

研究者番号: 00345125

(3)連携研究者

小宮 健 (KOMIYA KEN)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・
助手

研究者番号: 20396790

陶山 明 (SUYAMA AKIRA)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号: 90163063

萩谷 昌巳 (HAGIYA MASAMI)

東京大学・情報工学(系)研究科・教授

研究者番号: 30156252

研究協力者

Ibrahim, Zuwairie

University Technology Malaysia・

Assistant Professor