

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700362
 研究課題名（和文） 微小液滴内のDNA演算反応を利用した動的構成可能なオンチップ分子解析技術
 研究課題名（英文） Reconfigurable on-chip molecular analysis using DNA operations in micro-droplets
 研究代表者
 小倉 裕介（OGURA YUSUKE）
 大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授
 研究者番号：20346191

研究成果の概要（和文）：本研究では、処理手続きを動的に構成可能なオンチップ分子系解析について検討した。DNA情報を簡便に解析するためのDNA論理演算系を作製し、その基本動作を確認した。蛍光カラータグによる液体マイクロリアクタの識別法を構築した。また、液体マイクロリアクタの光学的操作による局所的・選択的なDNA反応制御法を開発し、この手法を用いて、液体マイクロリアクタ内で正しくDNA論理演算が行えることを実証した。

研究成果の概要（英文）：We studied on-chip molecular analysis in which a processing procedure can be configured dynamically. Two logic operation systems were investigated for easy analysis of DNA information. A method for identifying liquid-based microreactors was constructed using fluorescence color encoding. We demonstrated local and selective induction of DNA reactions by optical manipulation of liquid-based microreactors, and execution of DNA logic operations inside the microreactors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：応用光学

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：DNA コンピュータ、光ピンセット、生体生命情報学、システムオンチップ、情報システム

1. 研究開始当初の背景

オーダーメイド医療や創薬スクリーニングなど、生体分子を対象にした解析技術の重要性が高まっている。その一つのアプローチとして、生体分子情報をその場（分子が存在する環境下）で取得、処理できる分子計算は有望である。特にDNAは、Watson-Crick相補性に基づく自律反応性を有し、種々の生体分子とのインタラクションが可能な優れた情報キャリアである。これまでに、分子入出力を有する論理演算や有限オートマトン、分子メモリなどによりDNAの計算能力が実証されている。研究代表者は、フォトニクス技術との融合によるDNA計算-フォトニクス

DNA コンピューティングを提案し、研究を進めてきた。これは、DNA計算素子の介在により、外部光信号に応じた分子系の取り扱いを実現する。

この一方で、分子反応プロセスをチップ上で実行するラボオンチップ技術が進展している。微小流路を用いて試料の反応や検出を行なうマイクロ流体チップはその好例であり、省資源化や反応高速化だけでなく、微小空間利用による新機能の創出にも有効である。ただし、流路パターンを基板上に作り込むと、大量の試料に対する同一プロセスの自動実行には適するが、試料の状態に依存した処理など適応的な操作は容易ではない。これ

に対し、反応空間を液体マイクロリアクタによって区切り、それらのリアクタを光学的に自由に操作して反応を進める手法が有効であると考えられる。液体マイクロリアクタは、その内部に試料を安定して保持できる上、複数のリアクタの溶液の混合が可能であり、微小な反応空間として大きな潜在能力をもつ。

2. 研究の目的

本研究は、解析対象となる分子系の処理手続きを動的に構成可能なオンチップ分子解析を実現するための技術開発を目的とする。このため、分子反応空間としての液体マイクロリアクタの並列光操作技術と、分子情報のその場取得や処理が可能な DNA 計算技術を融合した方式の機能を実証する。具体的には、以下の3つの研究目標を設定する。

(1) 液体マイクロリアクタを用いた分子情報処理に適した DNA 演算系を設計し、その特性を明らかにする。

(2) 空間光変調器を用いた光学的操作法に基づく並列 DNA 反応システムを作製し、その性能を評価する。

(3) 液体マイクロリアクタでの DNA 論理演算を実証し、処理手続きの動的構成が可能な分子情報解析の基盤技術としての能力を示す。

3. 研究の方法

まず、分子情報に対する論理演算系を開発した。複数の液体マイクロリアクタで階層的に処理を実行することを考慮すると、演算結果を次段の処理に反映させる必要がある。そこで、入出力を DNA とする方式、入力を DNA、出力を蛍光とする方式の2種類について検討した。実装は、DNA 演算技術に光技術を組み合わせる。設計した論理ゲートの動作を実証し、性能を評価した。

システムの機能性や処理スループットを向上するためには、多数の液体マイクロリアクタ（直径 $10\mu\text{m}$ 程度）の並列操作手法が重要である。このため、空間光変調器 (SLM) を用いた光マニピュレーション法を用いる。液体マイクロリアクタとしては、リポソームを採用した。リポソームは細胞膜と同様の脂質二重膜をもつ人工小胞であり、内部にさまざまな分子を閉じ込めることができる。リポソームの光操作により局所的に DNA 反応を実行するため、リポソームの並列光操作法、内包物質の異なるリポソームの識別法、リポソームの選択的融合法、などの開発を進めた。

処理手続きの動的構成にはリポソーム内の DNA 演算技術を構築する必要がある。そこで、DNA 演算素子と対象分子をリポソームに導入し、それらの光操作による DNA 演算を実証した。基本演算である AND 演算と OR 演算を対象に、正しく出力を得るための評価指

標を検証した。

4. 研究成果

DNA を入出力とした二入力一出力の DNA 論理ゲートを設計した。各ゲートには、ゲート駆動を制御するための DNA (演算指定 DNA) が付随している。この演算指定 DNA をさらに光で制御することで、外部光信号により処理内容を適宜構成することを可能にしている。実験では、材料の制限から、一種類のゲートにのみ光演算指定機能を導入した。演算例として、 $A \wedge B$ の演算を光により指定して実行したときの結果を図1に示す。出力は蛍光として得ている。光を照射、かつ、 $(A, B) = (1, 0)$ の場合のみ高い蛍光強度が得られている。この結果より、指定した演算を正しく実行されることが確認できた。これは、同一のハードウェア (DNA) 構成で、所望の演算を適応的に実施するとき有効である。

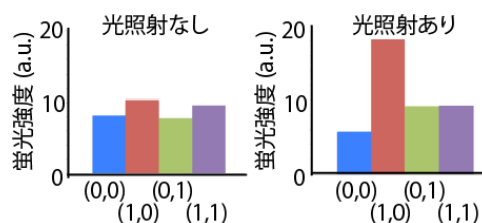


図1 光演算指定による演算結果。

また、DNA を入力、蛍光を出力とする DNA 論理演算法として、DNA スキャットホルド論理を考案した。本手法では、分子情報を蛍光修飾 DNA として符号化し、これらの DNA と足場となる DNA (DNA スキャットホルド) の結合により蛍光分子を配置する。その結果、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の経路が形成され、FRET によるナノスケールの光信号伝達により、レポーター蛍光分子から演算結果が出力される。このときの蛍光分子の配置は対象の分子系の状態に応じて変化するように設計されており、分子系の状態を判定できる。例として、 $A \wedge B \wedge C$ を実行するときの DNA 材料の模式図と実験結果を図2に示す。 $(A, B, C) = (1, 1, 1)$ のときに蛍光強度が高く、その他の入力で低くなっている。OR や NOT を含む演算についても所望の出力が得られることを確認した。本手法では、結合・解離反応や鎖置換反応などの単純な反応による自己組織化を計算過程として利用しており、演算の拡張性に優れている。さらに、論理評価に光信号伝達を利用することで、DNA 拡散反応の逐次実行が不要となり、従来の DNA 論理演算法と比較して演算速度の向上が期待できる。

液体マイクロリアクタを並列操作するため、ホログラフィック光ピンセットシステムを構築した。空間光変調器 (浜松ホトニクス

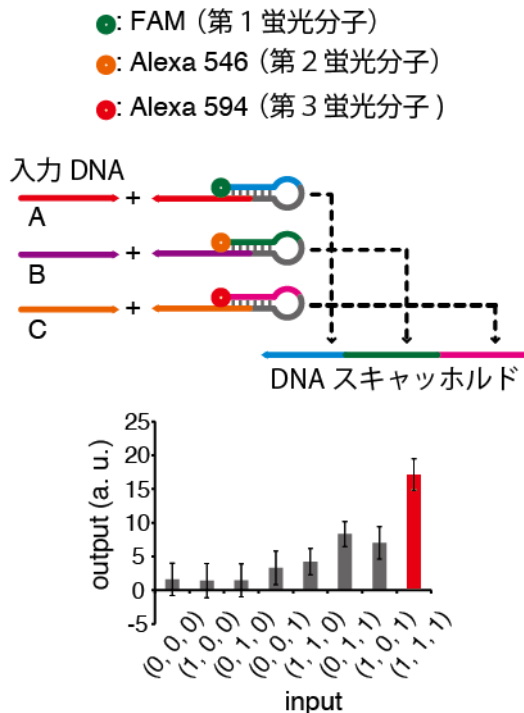


図2 DNA スキャットホルド論理による演算例.

(株), LCOS-SLM) に表示する位相変調分布を随時変更していくことにより, 試料面にさまざまな時系列光パターンを生成してマイクロリアクタを操作する. 光パターンの指定から実際の試料面での生成までのプロセスを実行するアプリケーションを独自開発し, 30 fps での光パターン切り換えレートを達成した. また, マウス操作により, 対象物体の自動整列, グループ操作, 自動輸送などをインタラクティブに行う機能が実装されており, 直感的な操作が可能である. 本システムにより, リポソームの並列操作実験を行った. リポソームの作製には遠心沈降法を用いた. なお, 光操作のためにはリポソーム内外に屈折率差が必要である. そこで, 内包液は 1.5 M のスクロース水溶液, 外溶液は 1.5 M のグルコース水溶液を基本とし, 内包液には必要に応じて試料や試薬を追加した. 並列操作の結果を図 3 に示す. マウス操作で光スポット位置を指定して 16 個のリポソームをトラップし, 整列命令により等間隔に整列させた. 次に 16 個全ての光スポットをグループ化し, 顕微鏡視野の左端から右端にかけて一括輸送を行った. サンプル面でのレーザーパワーは 63.8mW である. リポソームの輸送速度は約 0.18 $\mu\text{m/s}$ であった. 顕微鏡視野内でリポソームをその位置によらず安定して捕捉・並列操作できることを確認した.

複数種類のリポソームを扱う本手法では,

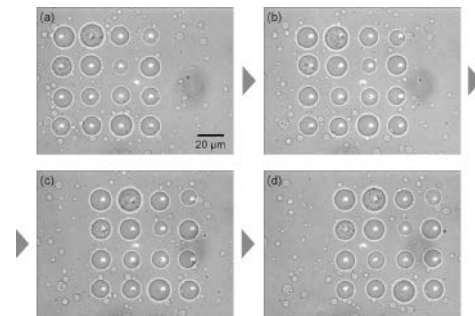


図3 リポソームの並列輸送.

個々のリポソームを識別する技術は重要である. 本研究では, 複数の蛍光色素を組み合わせることで1つのカラータグを構成し, その色情報から対象の判別を行った. 一般のカラーカメラで取得する RGB チャンネル信号は, リポソームの大きさによって値が変化してしまうため, 色を色相 (Hue), 彩度 (Saturation), 明度 (Value) の3成分を用いて表す HSV 色空間における色相に着目した. 紫外光で同時励起可能な3種類の蛍光材料を組み合わせることでカラータグを構成し, カラー取得画像の色相情報からリポソームの識別を行うことを試みた. 反応チューブ内において, 白色と, 色相値の異なる12種類の色を構成したところ, ほぼ所望の色相値の溶液が得られた. 次にリポソーム内にカラータグを導入し, 識別能力を検討した. 代表色相値を中心値に対してプラスマイナス6度許容することで, リポソームを識別できることが分かった. これはわずか3種類の蛍光色素で, 30種類の内包物を識別する能力をもつことを示唆している.

リポソームを選択的に融合し, そのリポソーム内でのみ反応を誘起する手法を検討した. その手順を図4に示す. リポソームを含む溶液に高電圧パルスを連続的に印可すると, 接触状態のリポソームが融合する. 接触状態を光操作により制御することで, 選択的にリポソームの融合が可能となる. 実際, 実験結果から, 接触させたリポソーム間でのみ融合が起き, 内包液の混合が行えることを確認した. また, リポソームを連続的に融合することにも成功している. 開発した手法は, 前段の処理結果を随時取得しながら, 後段の処理手順を組み立てることなどを可能にし, 動的構成可能な分子解析の基本技術となる.

DNA の鎖置換反応と蛍光共鳴エネルギー移動による発光制御を組み合わせる方式の DNA 論理ゲートを用いて, リポソーム内での DNA 論理演算を確認した. このゲートの入力は2種類の DNA であり, 出力は蛍光強度として得られる. 入力 DNA を内包するリポソームと DNA 論理ゲートを内包するリポソームを生成し, それらを融合して演算を実行した. AND 演算

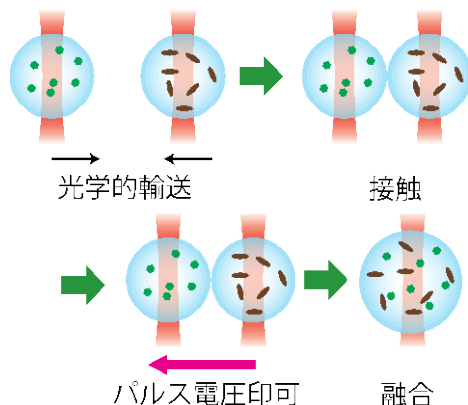


図4 リポソームの融合手順.

と OR 演算において、演算前後における DNA 論理ゲートからの蛍光強度比を演算出力の指標として用いて検証した。AND 演算においては、(1, 1) 入力時のみこの指標が 2 程度となり、その他の入力では融合による濃度低下で 1 未満に抑制された。また、OR 演算でも、(0, 1), (1, 0), (1, 1) 入力時には 1 以上の出力が得られたのに対し、(0, 0) 入力時は 1 未満であった。したがって、この指標のしきい値を 1 に設定すれば演算結果の判定が可能であり、リポソーム内において DNA 論理演算が正しく実行できることが実証できた。

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 7 件)

- (1) Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, and Jun Tanida, "Fluorescence resonance energy transfer-based molecular logic circuit using a DNA scaffold," *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 101, 233703 (2012), DOI: 10.1063/1.4769812. [査読あり]
- (2) Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, and Jun Tanida, "Optofluidic DNA computation based on optically manipulated microdroplets," *Microfluidics and Nanofluidics*, Vol. 12, (2012), DOI: 10.1007/s10404-012-0934-6. [査読あり]
- (3) 小倉裕介, 西村隆宏, 谷田 純, "フォトニック DNA ナノマシン", *光学*, Vol. 41, pp. 90-92 (2012). [査読なし]
- (4) Hiroto Sakai, Yusuke Ogura, and Jun Tanida, "Photonic Nanoscale Automaton Based On Photo-/Heat-Regulated DNA Displacement Reactions," *International Journal of Unconventional Computing*, Vol. 8, pp. 207-220 (2012). [査読あり]
- (5) Yusuke Ogura, Yuki Kazayama, Takahiro Nishimura and Jun Tanida, "Large-area manipulation of microdroplets by holographic optical tweezers based on a hybrid diffractive system," *Applied Optics*, Vol. 50, pp. H36-H41 (2011), DOI: 10.1364/AO.50.000H36. [査読あり]
- (6) Yusuke Ogura, Takahiro Nishimura, and Jun Tanida, "Spatially parallel control of DNA reactions in optically manipulated micro-droplets," *Journal of Nanophotonics*, Vol. 5, 051702 (2011), DOI: 10.1117/1.3574171. [査読あり]
- (7) 小倉裕介, "DNA コンピューティングの原理と展開", *生産と技術*, Vol. 63, 28-33 (2011). [査読なし]

[学会発表] (計 17 件)

- (1) Takahiro Nishimura, Yuki Kazayama, Yusuke Ogura, and Jun Tanida, "Optical Manipulation of Liquid-based Microreactors in Optofluidic DNA Computation," in *Optical trapping applications* (Hawaii, USA, April 17, 2013). [Invited]
- (2) 風山祐輝, 小倉裕介, 谷田純, "リポソーム内 DNA 論理演算の実証", 第 60 回応用物理学会春期学術講演会, (神奈川県工科大学, 2013 年 3 月 29 日).
- (3) 小倉裕介, 浅川洋平, 西村隆宏, 谷田 純, "光プログラム可能な DNA 論理演算法", レーザ学会学術講演会第 33 回年次大会, (姫路商工会議所, 2013 年 1 月 30 日).
- (4) Yusuke Ogura, Takahiro Nishimura, Hirotsugu Yamamoto, Kenji Yamada, Jun Tanida, "Photonic Nanoscale Logic Using Fluorescence Resonance Energy Transfer on a DNA Scaffold," in the *Second Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics* (Tokushima, Japan, Nov. 19, 2012). [Invited]
- (5) 風山祐輝, 小倉裕介, 谷田 純, "蛍光カラー符号化に基づく液体マイクロリア

クターの識別法”, 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2012 (タワーホール船堀, 2012年10月24日).

- (6) Yusuke Ogura, Takahiro Nishimura, Hirotsugu Yamamoto, Kenji Yamada, Jun Tanida, "Functional molecular sensing using photonic DNA nano-processor," in the 1st International Workshop on Information Physics and Computing in Nano-scale Photonics and Materials (Orleans, France, Sep. 7, 2012). [Invited]
- (7) 西村隆宏, 小倉裕介, 山田憲嗣, 山本裕紹, 谷田 純, "蛍光共鳴エネルギー移動を利用した分子入力・光出力論理回路の実装", 第59回応用物理学関係連合講演会 (早稲田大学, 2012年3月16日).
- (8) 風山祐輝, 小倉裕介, 鈴木宏明, 谷田 純, "光ピンセットを用いた液体マイクロリアクターのインタラクティブ制御", レーザー学会学術講演会第32回年次大会 (TKP仙台カンファレンスセンター, 2012年2月1日).
- (9) 西村隆宏, 小倉裕介, 山田憲嗣, 山本裕紹, 谷田 純, "蛍光共鳴エネルギー移動を利用したスキャフォールドDNA論理演算", 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2011 (大阪大学, 2011年11月29日).
- (10) 小倉裕介, 西村隆宏, 酒井寛人, 山本裕紹, 山田憲嗣, 谷田 純, "光とDNAの協調によるナノ情報処理", 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2011 (大阪大学, 2011年11月29日)
- (11) Yusuke Ogura, "Photonic DNA Processor: A Computing DNA-Nanomachine with Sensing and Acting Functions," in BIT's 1st Annual World Congress of Nano-S&T (Dalian, China, Oct. 25, 2011).
- (12) Takahiro. Nishimura, Yusuke Ogura, Kenji Yamada, Hirotsugu Yamamoto, and Jun Tanida, "A photonic DNA processor: concept and implementation," SPIE Optics & Photonics 2011 (San Diego, USA, Aug. 23, 2011). [Invited]
- (13) 西村隆宏, 小倉裕介, 山本裕紹, 山田

憲嗣, 谷田 純, "Bio-molecular sensing by use of DNA that can be activated and reset via photonic signals," 第49回日本生物物理学会年会 (兵庫県立大学, 2011年9月18日).

- (14) 酒井寛人, 小倉裕介, 谷田 純, "DNA配列置換反応を用いた光入力型DNAオートマトンの実装モデル", 2011年度秋季第72回応用物理学学会学術講演会 (山形大学, 2011年8月31日).
- (15) Yusuke Ogura, Yuki Kazayama, Takahiro Nishimura, Jun Tanida, "Optical Manipulation of Microdroplets by Use of a Spatial Light Modulator and a Static Computer Generated Hologram," in Information Photonics 2011, (Ottawa, Canada, May 19, 2011).
- (16) Yuki Kazayama, Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, Jun Tanida, "Evaluation of holographic optical tweezers based on a hybrid diffractive system for manipulating microdroplets," in Digital Holography and Three-Dimensional Imaging 2011 (University of Tokyo, Japan, May 11, 2011).
- (17) Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, Kenji Yamada, Hirotsugu Yamamoto, and Jun Tanida, "Prototype demonstration of a photonic DNA processor: a photonicly-controlled DNA nanomachine of sensing, computing, and actuating," in 8th Annual Conference on Foundations of Nanoscience (Snowbird, USA, April 14, 2011).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 裕介 (OGURA YUSUKE)

大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授
研究者番号: 20346191