

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 12 月 9 日 (09.12.2004)

PCT

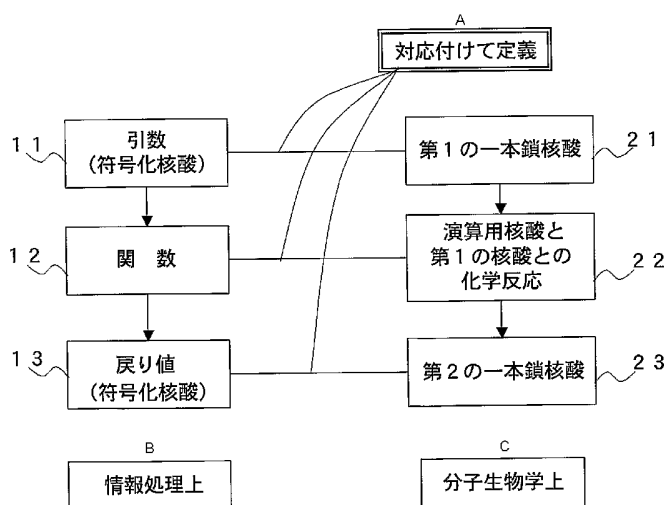
(10) 国際公開番号
WO 2004/107244 A1

- (51) 国際特許分類: G06F 19/00 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000952 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 陶山 明 (SUYAMA, Akira) [JP/JP]. 新田 尚 (NITTA, Nao) [JP/JP].
(22) 国際出願日: 2004 年 1 月 30 日 (30.01.2004)
(25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 鈴江 武彦, 外 (SUZUYE, Takehiko et al.); 〒1000013 東京都千代田区霞が関 3 丁目 7 番 2 号 鈴榮特許綜合法律事務所内 Tokyo (JP).
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願2003-155988 2003 年 5 月 30 日 (30.05.2003) JP (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: INFORMATION PROCESSING METHOD USING NUCLEIC ACID MOLECULES

(54) 発明の名称: 核酸分子を使用した情報処理方法



A...DEFINING IN RELATION WITH EACH OTHER
11...ARGUMENT (CODED NUCLEIC ACID)
12...FUNCTION
13...RETURN VALUE(CODED NUCLEIC ACID)
B...IN TERMS OF INFORMATION PROCESSING

21...FIRST SINGLE-STRAND NUCLEIC ACID
22...CHEMICAL REACTION OF NUCLEIC ACID FOR
CALCULATION WITH FIRST NUCLEIC ACID
23...SECOND SINGLE-STRAND NUCLEIC ACID
C...IN TERMS OF MOLECULAR BIOLOGY

(57) Abstract: An information processing method using nucleic acid molecules capable of acting autonomously and a molecule computer for calculation by the method are disclosed. The method is used for calculation using a function which receives an argument by a chemical reaction of a molecule and returns a return value. The method is characterized in that (a) a first coded nucleic acid defined in relation to a first decomposable single-strand nucleic acid is inputted as an argument, (b) calculation using a function defined in relation to a chemical reaction of a nucleic acid for calculation is carried out according to the argument, and (c) a second coded nucleic acid defined in relation to a second single-strand nucleic acid is obtained as a return value. The molecule computer is designed according to this method.

(57) 要約: 本発明は、自律的に稼働することができる核酸分子を使用した情報処理方法および該方法によって演算を行うための分子コンピュータを提供すること

[続葉有]

WO 2004/107244 A1



SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

を目的とする。上記の課題は、以下の方法により実現される。すなわち、本発明は、分子の化学反応により、引
数を受け取り戻り値を返す関数による演算を行う情報処理方法であって、(a) 分解可能な第1の一本鎖核酸に対
応付けて定義された第1の符号化核酸を引数として入力し、(b) 前記引数に基づき、演算用核酸の化学反応に対
応付けて定義された関数による演算を行い、(c) 第2の一本鎖核酸に対応付けて定義された第2の符号化核酸を戻
り値として得ることを特徴とする情報処理方法を提供する。また、該方法に基づいて設計された分子コンピュータ
を提供する。

明 細 書

核酸分子を使用した情報処理方法

技術分野

本発明は、DNA コンピュータに関する。

背景技術

生体分子が持つ性質を利用する非常にユニークな試みとして、DNA コンピュータが知られている。DNA コンピュータとは、DNA の配列上に入力値や計算プログラムなどを人為的に組み込んでやり、その DNA 分子に対して様々な反応、たとえば DNA 修飾酵素や制限酵素などの酵素反応や核酸同士のハイブリッド形成反応などをうまく組み合わせることによって計算を実行するものである。

DNA コンピュータの歴史は、1994 年に Adleman が DNA を使用した実験系で数学的な問題を解くことが可能であると実証したことにより始まった (Adleman LM、Molecular computation of solutions to combinatorial problems.、*“Science”*、(USA)、1994 年、266(5187)巻、p.1021-4)。この研究で Adleman は、有向ハミルトン経路問題という数学的な問題を、DNA 分子などを使用した実験系で解いたのである。またその翌年には、Lipton が DNA コンピュータを使用した充足可能性問題の解法を報告した (Lipton RJ、DNA solution of hard computational problems.、*“Science”*、(USA)、1995 年、268(5210)巻、p.542-5)。DNA コンピュータの計算アルゴリズムはその後にも多くの種類のものが考案され、単一 DNA 分子上での伸長反応を利用した技術 (Sakamoto K, Gouzu H,

Komiya K, Kiga D, Yokoyama S, Yokomori T, Hagiya M、
Molecular computation by DNA hairpin formation.、
“*Science*”、(USA)、2000 年、288(5469)巻、p.1223-6、
akamoto K, Kiga D, Komiya K, Gouzu H, Yokoyama S, Ikeda S,
Sugiyama H, Hagiya M、State transitions by molecules.、
“*Biosystems*”、1999 年、52(1-3)巻、p.81-91)や一本鎖 DNA
分子上のヘアピン構造を利用したもの(akamoto K, Kiga D,
Komiya K, Gouzu H, Yokoyama S, Ikeda S, Sugiyama H,
Hagiya M、State transitions by molecules.、“*Biosystems*”、
1999 年、52(1-3)巻、p.81-91)、DNA をメモリーとして利用し
固相上で適切な解を探し出す技術や(Liu Q, Wang L, Frutos
AG, Condon AE, Corn RM, Smith LM
DNA computing on surfaces.、“*Nature*”、(英)、2000 年、
403(6766)巻、p.175-9、ang L, Hall JG, Lu M, Liu Q, Smith
LM
A DNA computing readout operation based on structure-
specific cleavage.、“*Nat Biotechnol*”、(英)、2001 年、
19(11)巻、p.1053-9) プラスミドへの 2 本鎖 DNA の挿入・切
出しを利用する方法など多様な方法が考えられている。また、
その他でも DNA ではなく RNA を使用した分子コンピュータや
(Faulhammer D, Cukras AR, Lipton RJ, Landweber LF
Molecular computation: RNA solutions to chess problems.、
“*Proc Natl Acad Sci*”、(USA)、2000 年、97(4)巻、
p.1385-9)、DNA の自己組織化によるナノ構造を利用した技
術(Mao C, LaBean TH, Relf JH, Seeman NC、Logical

computation using algorithmic self-assembly of DNA triple-crossover molecules.、 “ *Nature* ” （英）、2000 年、407(6803)巻、p.493-6)なども報告されており、DNA コンピュータが包括する範囲は広がりつつあるといえる。

Adleman の研究を始めとする従来の多くの DNA コンピュータ技術は、特定配列の DNA 分子などを入力データとして扱い、その後の生物化学的な操作ステップのプロトコルでプログラムを規定している。最近ではロボットを使用した各種反応の自動化技術による大規模計算実現の研究も行なわれている（特開 2002-318992 号公報、特開 2002-181813 号公報、Morimoto N, Kiyohara H, Sugimura N, Karaki S, Nakajima T, Makino T, Nishida N, Suyama A、Automated processing system for gene expression profiling based on DNA computing technologies.、 “ *Eighth International Meeting on DNA Based Computers* ”、（Japan）、2002 年、Hokkaido University、Suyama A、Programmable DNA computer with application to mathematical and biological problems.、 “ *Eighth International Meeting on DNA Based Computers* ”、（Japan）、2002 年、Hokkaido University）。これとは異なる方向性として、自律的に動作する分子コンピュータも研究されている。これはプログラムを進める上で反応液に対して外から操作を加える必要がなく、入力データおよび計算プログラムを DNA 分子として反応液中に与えると、一定条件下で自律的に動作して計算結果を出力するものであり、チューリングマシンをモデルに開発された分子コンピュ

ータ技術が発表された (Benenson Y, Paz-Elizur T, Adar R, Keinan E, Livneh Z, Shapiro E, Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules., “*Nature*”、(英)、2001 年、414(6862)巻、p.430-4)。自律的に稼動する分子コンピュータは、生体細胞内など従来のコンピュータでは不可能であった環境で計算を実行するポテンシャルを有することから注目を集めている。

これら DNA コンピュータ研究の目的は、主に大規模な並列計算を実現することにある。すなわち、試験管の中には非常に多数の DNA 分子が存在可能であり、その DNA 分子一つ一つに計算の初期値や計算プログラム自身等をあらかじめ組み込んでおき、それら DNA 分子の集合体に対して一斉に計算のプロセスとなる化学反応を行なうことによって、非常に多岐にわたる初期値ないし計算プログラムによる計算を一度に並列して行なうことができるというアイデアである。このように、DNA コンピュータの系が持つ特長である並列性を利用して並列計算などの数学的計算を効率的に行なう系を開発する目的で研究が行なわれてきた。

生体反応を数学的目的で応用する研究は、そのユニークな発想とポテンシャルから広く関心を集めるものの、具体的な応用技術となると研究は未発達であり、その将来性は未知数であるというのが現状である。特に電気信号による従来型のコンピュータの処理能力は年々拡大しており、これと比べて分子コンピュータが処理能力や正確性などの面で上回ることは非常に困難であると考えられる。従来型のコンピュータと

は異なる、分子コンピュータの有用性を発揮できる適応分野が開拓されることが望まれる。そのような中で、最近では DNA コンピュータを遺伝子の発現解析や SNPs 解析に役立てようとする研究の動きが出ている (Nishida N, Wakui M, Tokunaga K, Suyama A, Highly specific and quantitative gene expression profiling based on DNA computing, “*Genome Informatics*”、2001 年、(12)巻、p.259-260、Mills AP Jr, Gene expression profiling diagnosis through DNA molecular computation, “*Trends Biotechnol*”、2002 年、20(4)巻、p.137-40)。これは生体分子を直接入力データとして扱える分子コンピュータ特有の性質を生かした応用分野として有望である。しかしながら生体の解析に応用可能な分子コンピュータとして従来提案されてきたものは自律的に稼動するものではなく、その応用範囲も限られていた。

核酸分子が含有する情報にアクセスする手段として核酸同士のハイブリダイゼーション反応が利用されるが、一度情報にアクセスするとその部位に核酸同士の安定なハイブリッドが形成されることからそのままでは再びアクセスできなくなる。しかしながら、核酸が含有する情報を利用した分子コンピュータを構成する際には繰り返し連鎖的に情報にアクセスすることが望ましい。そのためには、ひとたび二本鎖となってアクセス不能となった核酸分子上の情報を、再びアクセス可能にするプロセスが必要となる。従来の多くの DNA コンピュータは、熱を加えて核酸を変性させることによりこのプロセスを実現している。しかしこの方法では外部からの温度

コントロールが必須となり、自律型分子コンピュータは実現しない。自律型分子コンピュータを実現するためには、二本鎖の核酸に閉じ込められた情報を、酵素などの分子反応などを活用することで再びアクセス可能とすることが鍵となる。Shapiro らの分子コンピュータ (Y. Benenson et al, DNA molecule provides a computing machine with both data and fuel, “*Proc. Natl. Acad. Sci.*”、2003 年、100 巻、p.2191-6) は、制限酵素の切断で二本鎖 DNA から一本鎖 DNA の切断面を露出させることにより、自律型分子コンピュータの実現を成功させた例がある。

発明の開示

上記のような状況に鑑み、本発明は、自律的に稼働することができる核酸分子を使用した情報処理方法および該方法によって演算を行うための分子コンピュータを提供することを目的とする。

上記のような状況に鑑み、本発明は、自律的に稼働することができる核酸分子を使用した情報処理方法および該方法によって演算を行うための分子コンピュータを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

上記の課題は、たとえば以下の方法により実現される。すなわち、本発明は、分子の化学反応により、引数を受け取り戻り値を返す関数による演算を行う情報処理方法であって、

(a) 分解可能な第 1 の一本鎖核酸に対応付けて定義された第 1 の符号化核酸を引数として入力し、

(b) 前記引数に基づき、演算用核酸の化学反応に対応付けて定義された関数による演算を行い、

(c) 第2の一本鎖核酸に対応付けて定義された第2の符号化核酸を戻り値として得ること、

を特徴とする情報処理方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、レトロウイルスのゲノム複製サイクルの模式図を示す。

図2は、本発明の方法の基本的な処理を示す処理フローを示す。

図3は、本発明の方法の基本的な処理を示す処理フローを示す。

図4A～4Cは、分子コンピュータに使用する反応の模式図を示す。

図5A、5Bは、本発明の情報処理方法の概念図を示す。

図6A～6Eは、各種基本関数の模式図を示す。

図7A～7Cは、遺伝子のコード化と論理演算による遺伝子解析方法の模式図を示す。

図8A～8Cは、ニューラル・ネットワークによる遺伝子解析方法の概略を示す。

図9A、9Bは、FRETによる検出のための演算用核酸を示す。

図10は、高温反応条件におけるRNA依存DNAポリメラーゼ活性の測定結果を示す。

図11は、高温反応条件におけるDNA依存RNAポリメラ

ーゼ活性の測定結果を示す。

図 12 は、高温反応条件における DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性の測定結果を示す。

図 13 は、本発明の方法において使用した TGTP-P1 プライマーの概略図を示す。

図 14 は、TGTP-P1 プライマーを使用した伸長の活性と特異性を示す電気泳動写真である。

図 15 は、TGTP 遺伝子の発現を検出するための遺伝子のコード化関数の概略図を示す。

図 16 は、TGTP 遺伝子の発現を検出するための関数による演算の出力結果を示す。

図 17 は、TGTP 遺伝子の発現を検出するための関数による演算の出力結果を示す。

図 18 は、複数の RNA 分子にまたがる経路の逆転写反応に使用した符号化核酸の概略図を示す。

図 19 は、複数の RNA 分子にまたがる経路の逆転写反応の反応産物の電気泳動写真を示す。

図 20 は、論理演算反応のための演算用核酸の概略図を示す。

図 21 は、論理演算反応の結果を示す。

図 22 は、TGTP 遺伝子のセンス鎖 RNA を増幅するための Amplify 関数に使用する演算用核酸を示す。

図 23 は、TGTP 遺伝子のセンス鎖 RNA を増幅するための Amplify 関数による演算結果の電気泳動写真を示す。

図 24 は、関数を多層に重ねた場合の反応の一例を示す。

図 25 は、反応産物中の Code[4,5,6]RNA の検出結果を示す。

図 26 は、反応産物中の Code[3,2]RNA の検出結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、以下の思想に基づいて本発明を完成するに至った。

RNA ゲノムを有するウイルスの一種であるレトロウイルスは、宿主細胞内にてゲノム複製を行なうことが知られている(図 1)。RNA ゲノムの複製は、逆転写酵素の RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性により RNA を cDNA へと逆転写することによって開始する。これは細胞内の tRNA がゲノム上の primer binding site (PBS) に特異的に結合してプライマーとして働くことによって開始される。ここから逆転写反応が開始され、一度ゲノムの 3'末端まで cDNA が合成された後、さらにゲノム 5'末端への鎖の転移とそれに続く逆転写反応が行なわれる。その結果、全長ゲノムの第 1 鎖 cDNA が形成される(Mak et al. Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* 1997 Nov;71(11):8087-95)。形成された DNA-RNA ハイブリッドのうちの RNA 鎖は逆転写酵素の RNaseH 活性により除去される。残された一本鎖 DNA は、さらに DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性により二本鎖 DNA となり、これがゲノムに組み込まれてプロモータ部位からゲノム配列が転写される。その結果、もとのゲノムと同一の配列を有するゲノム RNA が生成される。なお、細胞内に存在する long terminal repeat (LTR) レトロトランスポゾンなども同等の機構により配列を複製することが知られており、2 本鎖 DNA 上の配列を 1 本鎖 RNA へと転

写した後、再び逆転写および DNA2 本鎖化がなされて複製される (Wilhelm Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons. *Cell Mol Life Sci* 2001 Aug;58(9):1246-62)。

上記レトロウイルスのゲノム複製は、4 つの特徴的な反応により構成されている。第 1 は、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性による逆転写反応である。第 2 は、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性による DNA2 本鎖化反応である。第 3 は、DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性による転写反応である。また、逆転写反応および DNA2 本鎖化反応の際に、RNaseH 活性により DNA-RNA ハイブリッドの RNA 鎖が除去されることも完全長ゲノムを複製する上で重要な役割を有する。この 4 種の反応の組み合わせにより、ゲノム増幅は実現している。このような一連のシステムを一種のコンピュータと捉えたと、レトロウイルスは、宿主細胞というハードウェア内における上記 4 種の反応活性を活用して、自らのゲノム RNA という入力に対して、複製された同一配列の RNA を返すというプログラムを実行していると思えることができる。

また、上記 4 つの反応を巧みに組み合わせることにより、レトロウイルスの自己ゲノム複製プログラムとは異なったプログラムを実行させることも可能であると考えられる。そこで、本発明は、これら 4 つの反応によって構成される分子コンピュータの設計を試みた。ここで設計した分子コンピュータは、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性、DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性および RNaseH

活性を同時に実現する反応液をハードウェアとして使用する。この中に入力データとしての RNA サンプルを与え、RNA 分子を引数および戻り値とする「関数」による演算を行う。本発明では、このハードウェア中で動作する基本的な関数として、いくつかの例を定義した。さらに、これらの関数を適宜組み合わせることにより、プログラムを構成することが可能となり、遺伝子発現解析などにも応用できる。このような分子コンピュータは、導入するプログラムにより異なる効果を示すことができる。したがって、プログラム可能な汎用分子コンピュータであるといえる。

また、レトロウイルスのゲノム増幅システムは逆転写反応活性、DNA 二本鎖化反応活性、転写反応活性および RNaseH 活性より構成されるが、この機構を自律的な分子コンピュータに応用するにあたり最も特徴的な反応として、転写反応活性と RNaseH 活性を挙げることができる。レトロウイルス型の分子コンピュータでは、二本鎖 DNA 分子から一本鎖 RNA を精製する転写反応活性と、DNA-RNA ハイブリッドから RNA 鎖のみを取り除いて一本鎖 DNA を残す RNaseH 活性とが、分子コンピュータを自律型に稼働させるための鍵となる。

上述の思想から、本発明は、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性および DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性などのポリメラーゼ活性および RNaseH 活性等を有する酵素による分子の化学反応を利用して、自律的な反応の実行を実現し、引数を受け取り戻り値を返す関数による演算を行う情報処理方法を開発した。

ここで、「自律的」な反応とは、分子の化学反応を行う際に、外部から核酸の分離、精製等の操作を行わずに反応産物を得ることができることを意味する。すなわち、外部からの操作を必要とせずに、入力した引数に対する戻り値を出力する関数の演算が可能であることをいう。

また、本明細書において使用する「核酸」とは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、mRNA、全RNA、hnRNAおよび合成RNAを含む全てのDNAおよびRNA、並びにペプチド核酸、モルホリノ核酸、メチルフォスフォネート核酸およびS-オリゴ核酸などの人工合成核酸を含む。また、本明細書において「核酸」、「核酸分子」および「分子」とは交換可能に使用され得る。

本明細書において使用される「塩基配列」および「配列」の語は共に、特定の核酸を構成する塩基の並びを示すものである。

以下、図面を参照しながら発明の実施形態を説明する。

本発明の好ましい態様に従うと、核酸を使用した情報処理方法が提供される。本発明は、核酸分子を用いて計算を実施することにより、データの処理や遺伝子解析を自律的に実行可能な方法を開示する。また、核酸分子によりデータやプログラムを表現し、そのプログラムで定義された演算を分子反応に置き換えて自律的な反応の実行を実現する。

まず最初に、本発明の情報処理方法の開発に当たり、実行する演算の内容を分子の化学反応として実行可能なデータ形式に変更しておく。具体的には、分子の化学反応による演算

を実施する前に、情報を、予め分子を特定の符号に結びつけた符号化核酸に変換する。そして、その変換規則を使用して演算における変数および定数などのデータを符号化核酸に変換しておく。次いで、これらの符号化核酸による演算処理を行い、符号化核酸による出力を得る。得られた符号化核酸を、予め結びつけた情報に変換することにより、演算が実行される。

本発明の第 1 の態様の方法について、基本的な処理を図 2 および 3 の処理フローに従って説明する。

図 2 および 3 は、引数を受け取り戻り値を返す関数による演算を行う情報処理の工程を示す。

(S1) 引数 11 の入力を行う工程である。具体的には、分解可能な一本鎖核酸 21 に対応付けて定義された符号化核酸を引数として入力する。

(S2) 関数 12 による演算を行う工程である。具体的には、引数 21 に基づき、演算用核酸の化学反応 22 に対応付けて定義された関数 12 による演算を行う。「演算用核酸」は、入力した一本鎖核酸 21 等と反応し、所定の反応を経て特定の反応産物が産生されるように設計された種々の核酸である。すなわち、関数としての化学反応を進行させるために必要な配列を有する核酸であり、たとえば、プライマーおよびプロモータとして作用する。演算用核酸は複数であってもよく、1 つの関数による演算を行うために複数の演算用核酸を使用することができる。

(S3) 関数の戻り値 13 を得る工程である。具体的には、

一本鎖核酸 23 に対応付けて定義された符号化核酸 13 を得ることである。

ここで、上記「対応づけて定義された」とは、核酸の化学反応における操作が、情報処理上のどのような操作に該当しているかを表している。すなわち、情報処理上の符号化核酸（引数）11 が、化学反応に使用される分解可能な一本鎖核酸 22 に該当し、情報処理上の関数 12 による演算が、化学反応における演算用核酸および分解可能な一本鎖核酸などによる化学反応 22 に該当し、情報処理上の戻り値 13 が、化学反応の反応産物である一本鎖核酸 23 に、それぞれ該当することを表している。

また、(S1) における引数の入力は、必ずしも分解可能な一本鎖核酸 21 に対応づけて定義された符号化核酸を引数とする必要はなく、分解可能な一本鎖核酸そのものを直接引数として入力することもできる。この場合、分解可能な一本鎖核酸自体による演算処理を行い、符号化核酸による出力を得る。さらに、(S3) において得られる関数の戻り値は、第 2 の一本鎖核酸 23 に対応付けて定義された符号化核酸 13 を得るだけでなく、第 2 の一本鎖核酸を直接戻り値として得てもよい。ただし、情報処理方法として関数による演算を行う場合、引数または戻り値のいずれか一方は、予め分子を特定の符号に結びつけた符号化核酸である。

本発明に使用する化学反応の例を図 4A に示す。

本発明の方法は、「入力」を分解可能な一本鎖核酸（たとえば、RNA 分子）により与える。情報処理上の「引数の入

力」は、分解可能な一本鎖核酸を反応液に添加することに対応する。以下、分解可能な一本鎖核酸として RNA を使用した場合を例に説明する。

入力した RNA 分子に対する演算用核酸（図 4A に示したプライマー）が存在すると、逆転写反応が引き起こされて入力を読み取られる。ここで、逆転写反応によって形成された DNA-RNA ハイブリッドの RNA 鎖は、RNaseH 活性によって分解されることとなる。この RNaseH による分解は、従来の情報処理における入力情報の消去に該当する。

従来の DNA 分子を使用した情報処理方法では、入力した DNA を読み取った後、入力した DNA が分解されずに反応系に残ったままであった。したがって、その後の反応において該 DNA が不要な場合は、該 DNA を除去するために分離操作などの煩雑な操作が必要であった。このような分離操作には、外部からの一連の操作が必要であり、自律的に稼働させることは困難であった。たとえば、分離操作を自動処理するには、ロボットによる分離操作等が必要であった。しかし、分解可能な核酸分子を使用することにより、たとえば RNA 分子であれば、RNaseH の酵素活性により容易に入力した RNA 分子のみを消去することができ、反応系において自律的に反応を実行できる。本発明では、分解可能な一本鎖核酸として RNA 分子を使用したか、その他の分解可能な核酸分子を使用することもできる。

本明細書において、「分解可能」とは、所定の反応により「分解可能な一本鎖核酸」のみが分解され、その他の核酸は

分解されないことをいう。特に、演算用核酸が分解されないような条件下で「分解可能な一本鎖核酸」のみが選択的に分解されることを意味する。たとえば、「演算用核酸」として DNA を使用した場合、RNA は、RNaseH によって選択的に分解されることから「分解可能」であるといえる。また、「演算用核酸」が RNA である場合に純粋な DNA 分解酵素を用いると、DNA のみを選択的に分解することができ、このような条件下においては DNA が「分解可能」な核酸ということになる。すなわち、「分解可能」とは相対的な概念といえる。

「分解可能」な核酸のその他の例として、演算用分子が DNA である場合におけるウラシル含有 DNA (A RACHITT for our toolbox, Nature Biotechnology, April 2001 Volume 19 Number 4 pp 314 - 315、DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes, Nature Biotechnology, April 2001 Volume 19 Number 4 pp 354 - 359)、および演算用分子が Peptide Nucleic Acid である場合における DNA や RNA などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

また、本発明の方法において、引数として入力する核酸は、一本鎖の核酸である。核酸による情報処理方法では、核酸配列上の情報にアクセスするためにハイブリダイゼーション反応を利用している。したがって、入力に 2 本鎖 DNA を使用する従来の技術では、該 2 本鎖 DNA に演算用核酸などをハイブリダイズさせるために、2 本鎖 DNA を一本鎖にする反応が必要である。しかし、このような反応は、通常温度の制御が必

要であり、外部から一連の操作を行わなければならなかった。このため、上記分離操作と同様に、自律的に反応を実行させることが困難であった。

また、核酸が分解可能でない場合、ハイブリダイズした核酸が二本鎖を形成したままとなるため、一本鎖にするために温度制御等が必要となる。

しかし、本発明の方法では、分解可能な一本鎖核酸を使用するため、該核酸は、ハイブリッドを形成した後に分解される。したがって、自律的な演算が可能となる。すなわち、一定温度のままでも演算用核酸の化学反応を行うことが可能であり、自律的な分解反応が実行される。たとえば、以下の実施例において検討したとおり、50℃の一定温度において自律的な反応を行うことができる。

一方、RNAとして入力した情報は、RNaseHによって分解されて消去されると共に、より安定な核酸分子（たとえば DNA 分子）に逆転写されることにより、より安定な状態で記憶・保存することもできる。また、残された一本鎖 DNA は、さらに別の RNA に対するプライマーとして働く、すなわち、演算用核酸として繰り返し機能することもできる。したがって、該 DNA からさらに伸長反応が進行することも考えられる（図 4B）。本明細書において、図 4B のように配列 a のプライマーが 1 つ以上の RNA 鎖上を逆転写することによって生じた配列を「配列 a で開始した RNA 上の経路」と呼ぶ。得られた一本鎖 DNA は、さらに該一本鎖 DNA に相補的なプライマー（これも演算用核酸の一つである）の存在のもとで二本鎖 DNA とな

る。この二本鎖 DNA から転写された RNA 分子を、関数による演算の出力として得ることができる(図 4A)。

T7 RNA ポリメラーゼなどの転写酵素の転写活性が誘導されるためには、プロモータ部位が 2 本鎖 DNA である必要があることが知られている (Milligan et al. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res* 1987 Nov 11;15(21):8783-98)。本発明では、この性質を利用して出力をコントロールする(図 4C)。たとえば、演算用核酸として使用するプライマー上にプロモータ配列をあらかじめ組み込んでおき、該核酸が一本鎖 DNA のままではプロモータ配列から RNA の転写が生じないが、二本鎖になったときにプロモータ配列が酵素に認識され、転写活性の起点として機能することを利用する。

本発明の情報処理方法は、RNA による入力を受け付け、各種反応が生じた結果として RNA による出力を返す一連のシステム全体が 1 つのコンポーネントとなっている。上述したとおり、このようなコンポーネントを、RNA による「引数」を受け取り RNA による「戻り値」を返す「関数」と呼ぶ(図 5A)。

本発明の情報処理方法では、戻り値を一本鎖核酸として得ているため、この戻り値に再アクセスすることも容易である。また、各関数は引数および戻り値が同じ分子(共に分解可能な核酸分子である RNA)であることから、ある関数の戻り値が他の関数の引数となることが可能である。すなわち、ある

関数によって得られた戻り値をさらなる関数の引数として使用し、さらなる戻り値を得ることができる。また、1つの関数における引数は一つとは限られず、複数の引数をとることも可能である。このとき、複数の関数の戻り値を引数として、さらなる戻り値を得る関数を定義することもできる。このような関数を複数組み合わせ、所定の戻り値を得ることもでき、関数、引数および戻り値の組合せにより記述されたプログラムに従って複数の関数による演算を行うことにより、該プログラムの計算結果を戻り値として導出することもできる。

また、上記一連のシステム全体を分子コンピュータであるとする、と、所望の関数による演算を行うための演算用核酸、適切な反応液および適切な酵素で構成される反応液は、この関数による演算を実現するためのコンピュータの「ハードウェア」に該当する。DNA(もしくは RNA)プライマーなどの演算用核酸によって「プログラム」が定義され、実際に引き起こされる反応が決定されることとなる(図 5B)。本発明の情報処理方法を使用することにより、RNA による入力を受けてハードウェアとしての反応液中で反応を行い、結果を RNA により出力することが可能な分子コンピュータ実現される(図 5B)。

(各種基本関数の設計)

次に、上述した関数による演算の具体例を以下に示す。

本発明の情報処理方法で実現される関数は、演算用核酸によって定義される。演算用核酸は、たとえば、一本鎖核酸に対してプライマーとして作用する配列、プロモータ配列およ

び任意の核酸のプライマーとして作用する配列から選択される一以上の配列を有するプライマーであることが好ましい。分解可能な核酸分子として RNA 分子を引数とする場合、本発明による関数の演算には、この一本鎖 RNA にプライミングして DNA の伸長反応を引き起して第 1 鎖 cDNA を形成させる第 1 プライマー (P1) と、第 1 鎖 cDNA にハイブリダイズする第 2 プライマー (P2) との 2 種類の演算用核酸が必要である。これらのプライマー上のいずれかの位置にプロモータ配列を組み込むことにより、そのプライマーが二本鎖 DNA となったときに転写活性が誘起される。その結果、特定の RNA が出力される。上記関数の例として、プロモータ配列を配置する際の位置および向きにより、たとえば以下に示す 4 通りの関数が考えられる (図 6A, B, C, D)。また、引数をとらない関数も考えられる (図 6E)。その他、当業者であれば、上記関数に基づいて種々の関数を定義することが可能であろう。

以下、上記 5 つの関数について詳細に解説する。

基本関数 A: $\text{Path}(a \rightarrow b) \Rightarrow X$

配列 a より始まり配列 b を通過する RNA 上の経路が存在する場合に、指定した配列 X の RNA を返す関数である。

P1 は、5'末端方向のプロモータ配列と、その下流に X の逆相補鎖配列と、その 3'末端に a の相補鎖配列とを有するプライマーであり、プライマー P2 の塩基配列は、b である (図 6A)。このように設計した P1、P2 を含む反応液中に配列 a を有する RNA 分子が存在すると、P1 から逆転写反応が起こる。この反応の際に、図 4B に示したように複数の RNA

分子上を辿る反応が生じてよい。具体的には、プライマーより逆転写反応が起こった際に生成された一本鎖 cDNA の 3' 末端が他の RNA と結合してプライマーとして働き、再び逆転写反応を開始する場合が含まれる。このとき、逆転写反応が辿った塩基配列 (図 4B の場合 $a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow d$) を、特に「配列 a より開始した RNA 上の経路」と呼ぶこととする。またその経路を構成する RNA 分子上の配列 (この場合 $a \rightarrow b$, $b \rightarrow c$ 及び $c \rightarrow d$) を「経路素子」と呼ぶ。

次に、P1 からの逆転写反応によって形成された一本鎖 DNA 上に配列 B と相補的な配列が存在すると、プライマー P2 が結合して第 2 鎖 DNA の合成が開始される。これにより、P1 上のプロモータ配列が二本鎖化されて転写が誘発されて、プロモータの下流に配置された配列 X の RNA 分子が出力される。すなわち、本反応は、配列 a より開始した RNA 上の経路が配列 b を通過する場合に配列 X の RNA を返す関数となる。

基本関数 B: $\text{Path}(a \rightarrow b \rightarrow b' \rightarrow b'' \dots) \Rightarrow X$

配列 a より始まり配列 b で終結する RNA 上の経路が存在する場合に、指定した配列 X の RNA を返す関数である。なお、終結条件は、「b もしくは b'、b''…」のように、並列的に拡張することもできる。

P1 は、a の相補鎖配列を有するプライマーであり、P2 は、5'末端方向のプロモータ配列と、その下流に配列 X と、その 3'末端側に配列 b とを有するプライマーである (図 6B)。ここに配列 a を有する RNA 分子が入力されると、そこから RNA 上の経路に沿って逆転写反応が起こる。その経路が配列

b の相補鎖で終結した場合、その末端の配列は P2 の配列 B と結合してプライマーとして機能し、その結果二本鎖となったプロモータ配列の下流に配置された配列 X が転写される。なお、P2 上には、プライマーが結合する配列が b、b'、b''... というように複数配置されていてもよい。この場合は、経路の終結条件が b、b'、b''... と並列的に拡張される。また、この関数では P2 そのものは伸長反応を起こす必要がない。したがって、P2 の 3'末端に特殊な修飾や塩基配列を付加しておくこともできる。

基本関数 C: Amplify (a -# b [--add5 P] [--add3 Q])

配列 a より始まり配列 b で終結する RNA 上の経路が存在する場合に、その配列の RNA を増幅する関数である。また、増幅配列の 3'末端または 5'末端に、任意の配列 P または Q が付加された RNA を増幅することもできる。

P1 は、a の相補鎖配列を有するプライマーであり、P2 は、3'末端方向のプロモータ配列と、3'末端の配列 b とから構成される (図 6D)。ここに配列 a に相補的な配列を有する RNA 分子が入力されると、RNA 上の経路に沿って逆転写反応が起こる。この経路が b の相補鎖配列で終結した場合、その末端配列が P2 の配列 b と結合してプライマーとして機能し、その結果二本鎖となったプロモータ配列の下流に配置された a から b までの経路の相補鎖 (もとの入力 RNA と同一の鎖) の配列を有する RNA が転写される。さらにこの関数の戻り値は再帰して同一関数の引数となるため、ループを形成して遺伝子配列の増幅を引き起こす。また、必要に応じて P1、P2 各

プライマーに配列 P、および Q の相補鎖配列を組み込むことにより、出力される RNA 分子の 5' 末端または 3' 末端に任意の配列 P または Q を付加することができる。

基本関数 D: `RevAmplify (a -> b [--add5 P] [--add3 Q])`

配列 a より始まり配列 b を通過する RNA 上の経路が存在する場合に、その逆相補鎖配列の RNA を増幅する。また、増幅配列の 3' 末端または 5' 末端に、任意の配列 P, Q を付加することもできる。

P1 は、3' 末端方向のプロモータ配列と、3' 末端の配列 a 相補鎖とから構成され、P2 は、配列 b を有する (図 6D)。ここに配列 a を有する RNA が入力されると、RNA 上の経路に沿って逆転写される。さらにその経路が配列 b の相補鎖配列を通過すると、P2 が該配列に結合してプライマーとして機能し、DNA2 本鎖化反応を誘起する。その結果、P1 上のプロモータ配列も二本鎖 DNA となり、配列 a から b までの経路配列 (もとの入力 RNA の逆相補鎖配列) の RNA を転写する。なお、出力された逆相補鎖 RNA には、さらに P2 が結合して逆転写反応が行われる。転写された DNA には、P1 が結合して DNA 二本鎖化反応が生じ、再び同一の RNA が出力される。この反応は、本関数を実装するプライマー P1 および P2 の役割が入れ替わることにより、もとのプライマーが逆相補鎖 RNA を引数とする基本関数 C: `Amplify (b -# a)` として機能すると表現することもできる。この関数も、基本関数 C と同様に、出力される RNA 分子の 5' 末端または 3' 末端に任意の配列 P ま

たは Q を加えることができる。

基本関数 E: Output () RNA X

引数を必要とせず、常に配列 X の RNA を出力する。

基本関数 E は、引数としての RNA 分子を必要とせず、常に配列 X の RNA を転写するように設計してある。この関数は、プロモータ配列とその下流に続く配列 X からなる二本鎖の DNA 分子によって実現される。

(基本関数の組み合わせによるプログラム構築)

上記基本関数を組み合わせることにより、高次な関数を構築することことができる。さらに、上記関数、引数および戻り値を組み合わせることでプログラムを構築することこともできる。しかし、図 5 に示したようなプログラムを化学反応により実行する際に、特に演算用核酸の設計に注意する必要がある。上記基本関数 A、B、C および D は、最初に逆転写反応を引き起こす演算用核酸をプライマー P1 とし、続く DNA 二本鎖化反応を引き起こす演算用核酸をプライマー P2 として分類している。しかし、関数の実体として反応液中被加えられるプライマーは、基本関数 A と B とでは同等であり、また C と D とで同等である。たとえば、基本関数 A : Path (a → b) ⇒ X を実装するプライマー・ペアは、プライマー P2 が第 1 プライマーとして機能してしまえば、基本関数 B: path (b → a) ⇒ X として働く。あるいは、プライマー P1 が第 1、第 2 プライマーとして機能すれば、path (a → a) ⇒ X なる出力を与えることも考えられる。

あるいは、プライマーがダイマーを形成することでプロモ

一タ配列が二本鎖となり、誤った戻り値を返してしまう可能性も考えられる。さらに複数の関数を単一の反応液中にて同時に実行する場合、相互作用を起こしうるプライマーの組み合わせは、関数の種類に応じて増大し、副反応の可能性がさらに広がる。副反応の影響を受けずに、狙った関数反応を効果的に実行するプログラムを実装するために、プログラムを組む際に副反応が発生し難いと考え関数の組み合わせを使用することや、反応に用いるプライマーの配列を特に注意して設計することなどといった配慮が特に重要である。

たとえば、演算用核酸として、正規直交化配列を含む核酸を使用することができる。「正規直交化配列」における「正規」の語は、複数の配列において熱的性質の正規性を維持すること、即ち、融解温度が一定の範囲内で揃っていることを示す。熱的性質の正規性を維持することによって、たとえば、多くの配列を纏めて使用して反応を行うことが有利に実行される。「正規直交化配列」における「直交化」の語は、配列に直交性を持たせることであり、1つの直交化配列群に含まれる全ての配列は、夫々独立して反応する、すなわち、1つの正規直交化配列群に含まれる配列は、所望の組み合わせ以外の配列間および自己配列内において反応が生じ難いか、または反応が生じない。言い換えれば、1つの直交化配列群に含まれる配列は、配列間でのクロスハイブリダイゼーションや、自己配列内での望まないハイブリダイゼーションが従来よりも生じ難いか、生じない。

上記のような正規直交化配列は、H. Yshida and A.

Suyama, "Solution to 3-SAT by breadth first search", DIMACS Vol.54 9-20(2000)および特願 2003-108126 に詳細が記載されている。これらの文献に記載の方法を使用して正規直交化配列を設計することができる。簡単には、予め無作為に塩基配列を複数作出することと、それらの融解温度の平均値を求めることと、その平均値の $\pm t^{\circ}\text{C}$ で制限される閾値を基に候補配列を得ることと、独立して反応する配列であるか否かを指標に得られた候補配列から正規直交化配列群を得ることを具備する方法によって作製することができる。

正規直交化配列である核酸群は、そこに含まれる夫々の塩基配列または核酸の融解温度がほぼ均一であり、互いにクロスハイブリダイゼーションを起こし難く、その自己二次構造が安定ではない。正規直交化配列は、たとえば、以下の実施例にコード配列として示す核酸にも使用することができる。

また、本発明の符号化核酸も、上記正規直交化配列であることが好ましい。しかし、たとえば、細胞から精製した総 RNA などを直接第 1 の符号化核酸として使用することもできる。すなわち、予め結びつけた情報を符号化核酸に変換して演算を行うのではなく、得られた核酸（たとえば、総 RNA のような、符号化されていない分解可能な核酸など）自体を情報として、そのまま符号化核酸として使用することもできる。たとえば、以下に示した遺伝子発現解析において本発明の方法を使用する場合などである。また、演算によって得られる第 2 の符号化核酸にさらなる演算を適用して、符号化していない一本鎖核酸を戻り値として直接得ることもできる。この

核酸は、mRNA であってもよいし、タンパク質に結合するアプタマー核酸であってもよい。さらに、特定の遺伝子 mRNA にハイブリダイズするアンチセンス RNA であってもよい。たとえば、以下に示した細胞内分子コンピューティングにおいて本発明の方法を使用する場合などである。

このような場合、入力に使用した RNA は、たとえば以下に示したように、一旦上記正規直交化配列を有する符号化核酸に変換してから、さらなる反応を行うことが好ましい。

(遺伝子発現解析プログラム)

以下に、上記基本関数の組み合わせによるプログラムの一例として、遺伝子発現解析に応用した例について記述する。

(遺伝子のコード化)

DNA マイクロアレイ等による遺伝子解析において、ハイブリッド形成を的確にコントロールすることを目的として、特定の遺伝子に対応するジップ・コードまたは内部コードに置き換える技術が開発されている (Gerry et al. Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol* 1999 Sep 17;292(2):251-62、 Nishida et al. Highly specific and quantitative gene expression profiling based on DNA computing. *Genome Informatics* 2001 (12) 259-260、 Wharam et al. Specific detection of DNA and RNA targets using a novel isothermal nucleic acid amplification assay based on the formation of a three-way junction structure. *Nucleic Acids Res* 2001 Jun 1;29(11):E54-4)。

本プログラムでは、基本関数 A ($\text{path}(a \rightarrow b) \Rightarrow X$) を使用する (図 7A)。ターゲット遺伝子の RNA を特異的に認識するプライマー・ペア配列として、配列 a および配列 b を使用する。これらの配列を演算用核酸の 3'末端に組み込む。また、出力される RNA の配列 X として、対応させたいコード配列をプロモータの下流に組み込んでプライマーを設計する。このようなプライマー・ペアを使用することにより、ターゲット遺伝子 RNA を入力すると対応するコード配列 RNA に変換される関数を作成することが可能である。また、基本関数 C (Amplify) や基本関数 D (RevAmplify) を使用することにより、ターゲット遺伝子の部分配列の 5'末端または 3'末端にラベルのための配列を付加することも可能である。

本プログラムを使用することにより、遺伝子のコード化が自律的な反応条件で実現される。たとえば、DNA マイクロアレイ等による遺伝子検出に応用することもできる。さらに、コード配列 RNA を他の関数による演算プログラムの入力として使用して、たとえば遺伝子発現解析プログラムを構築することもできる。

(各遺伝子の経路素子への変換と論理演算による遺伝子発現解析)

ここでは、各遺伝子を経路の素子にコード化することにより遺伝子発現解析を行う方法について説明する。図 7B に、遺伝子 A と遺伝子 B とが存在する場合に遺伝子 X を返すプログラム例を示す。

本プログラムは、遺伝子 A および B の RNA をコード配列へ

変換する関数と、経路を認識して遺伝子 X を返す関数よりなる。すなわち、遺伝子 RNA をコード化し、該コード化配列による演算を行なう。第一に、基本関数 A を使用して、遺伝子 A が存在する場合にコード配列 Code[2,1] を返すというコード化関数を考える。ここで、Code[2,1] は、各々 5' 末端から 3' 末端に向かってコード配列 Code[2]、Code[1] が並んだ配列を有する。同様に、遺伝子 B が存在する場合に Code[3]、Code[2] を並べた配列を有する Code[3,2] を返す関数を加える。なお、Code[1]、[2] および [3] は、任意の配列であってよい。しかし、反応液の条件でミス・プライミングなどを起こしにくく、プライミング効率が均一な配列を有することが好ましい。すなわち、上述した正規直交化配列であることが好ましい。

上記関数を組み合わせることにより、遺伝子 A が存在する場合にのみ経路素子 Code[1]→Code[2] が形成され、遺伝子 B が存在する場合にのみ経路素子 Code[2]→Code[3] が形成される。したがって、遺伝子 A と遺伝子 B の両方が存在している場合に限り、Code[1] より始まり Code[3] で終結するという RNA 上の経路が形成される（図 7B）。ここで、基本関数 B（もしくは基本関数 A）を使用して、該経路が存在する場合に RNA X を返す関数をさらに加える。その結果、両遺伝子が存在する場合に限り遺伝子 X を返すプログラムが実現する。

本方法の本質は、各遺伝子を、コード配列によって構成された仮想的な経路（この場合 1→2→3 なる経路）を構成する各経路素子（1→2 および 2→3）に変換し、その経路の存在

を検出することによって遺伝子の解析を行うことである。経路の規模や対応付けを行なう遺伝子の種類を増加させれば、より複雑な演算を行うことができる（図 7C）。あるいは、出力される配列 X の RNA をさらに別の経路への入力とすることにより、経路を多重に重ねることもできる。

（ニューラル・ネットワークによる遺伝子発現解析）

論理演算による遺伝子発現解析では、あらかじめ遺伝子の発現パターンが既知である必要がある。また、基本的に遺伝子の有無のみを解析するものであり、濃度の情報を評価できない。ここでは、未知の遺伝子発現パターンについて遺伝子の濃度情報をも評価することができる方法として、本発明の情報処理方法を使用して構築したニューラル・ネットワークの例を示す。

遺伝子の発現解析において、DNA コンピュータによって構成されたニューラル・ネットワークを応用するアイデアは以前にもあった(Mills Gene expression profiling diagnosis through DNA molecular computation. *Trends Biotechnol* 2002 Apr;20(4):137-40)。しかし、従来のアイデアは、中間層を持たない一層の単純パーセプトロンのモデルであり、複雑な解析は原理的に困難であった。さらに、複数ステップの操作が必要とした。一方、本発明の情報処理方法を使用することにより、複雑な解析を実行しうる多層パーセプトロンを自律的に稼動する反応系にて実現することができる（図 8A）。

遺伝子の解析を行なうために、まず遺伝子のコード化を行なう。コード化関数により RNA A が存在する場合に、

Code[a1, ST]が出力されるようにする。これは経路 $ST \rightarrow a1$ に対応付けられる。RNA B, C, D についても同様のコード化関数を設定し、各々経路 $ST \rightarrow a2, a3, a4$ へと置き換えるようにする。これらのコード化関数により、各遺伝子 RNA の存在に応じてニューラル・ネットワークへの入力が行なわれる。パーセプトロンの中間層を結ぶ経路ユニット： $a1 \rightarrow b1, a1 \rightarrow b2, a1 \rightarrow b3, \dots, b4 \rightarrow c4$ および $c1 \rightarrow X, c1 \rightarrow Y, c2 \rightarrow X, \dots, c4 \rightarrow Y$ は、全て基本関数 $E: \text{Output}()$ を使用して、対応する RNA を出力させることにより形成することができる。さらに、基本関数 B を使用して、経路 $ST \rightarrow X$ の存在に応じて x を返す関数 ($\text{path}(ST - \# X) x$) および経路 $ST \rightarrow Y$ の存在に応じて y を返す関数 ($\text{Path}(ST - \# Y) y$) を導入したプログラムを構築する。その結果、入力 RNA に応じて出力 x と y の割合が変化するニューラル・ネットワークが形成される(図 8A)。入力層、中間層および出力層の数は、適宜変更することができる。さらに、各 RNA 経路ユニットの強度は、対応する $\text{Output}()$ 関数の濃度を調整することによって制御することができる。

図 8B に示す方法を使用することにより、ニューラル・ネットワークに対する学習プロセスが実行できる。具体的には、第一に、入力および中間層を結ぶ経路に係る関数と ST プライマーとを含む反応液に、入力としてサンプル A 群および B 群の RNA を与えて、ST プライマーの伸長反応を実行させる。各反応液中では、与えられた入力 RNA および中間層経路の状況に応じて、ST より開始し X または Y で終結する各経路が

逆転写されて、対応する cDNA が合成される(①)。ここで、得られた ST プライマー伸長産物の末端配列が X のときと、Y のときに分けて経路の解析を行なう。A, B 群における各中間経路ユニット ($a1 \rightarrow b1$, $a1 \rightarrow b2$, ...) の濃度比較を行なう(②)。この作業は、たとえば、複合する経路を含んだサンプルを使用して、リアルタイム PCR 法や DNA マイクロアレイ法などによって行なうことが想定される。この結果をもとに、望ましい経路が増強されるよう $Output()$ 関数の濃度を調製する(③)。たとえば、A 群を出力 x に、B 群を出力 y に対応付けたい場合には、A 群サンプル-X 終結経路および B 群サンプル-Y 終結経路と、A 群サンプル-Y 終結経路および B 群サンプル-X 終結経路との比較を行ない、前者に特異的な経路ユニットを増加して後者に特異的な経路を減少させる。このサイクル①→②→③を繰り返すことにより、学習させることができる。

この分子コンピュータのニューラル・ネットワークによる遺伝子発現解析技術を利用して、新規な遺伝子診断技術を実現することもできる(図 8C)。たとえば、上記反応を行うために必要な演算用核酸を含む反応液を準備する。次いで、反応液に臨床サンプルより得られた RNA を添加して反応を進行させる。所定の遺伝子が所定の組合せで発現している場合に、所定の出力が得られるようにプログラムを構築しておけば、遺伝子がどのようなパターンおよび発現量で発現しているのか容易に解析することができる。

(関数の拡張)

本発明に使用する関数は、上記 5 つの関数に限定されない。種々の演算用核酸を使用して、多様な関数を定義することができる。

たとえば、上記基本関数は、全て、P1 が逆転写反応を引き起こし、そこで形成された cDNA に P2 がハイブリダイズするという構造としているが、P2 を RNA に対するプライマーとして機能させることもできる。このとき、伸長反応に従って P2 の 3'末端配列が変化している。この変化は、3'末端配列の変化につれて関数の内容が変化しているととらえられる。このような変化を利用することにより、関数の概念を拡張することができる。その他にも、ハードウェアの反応液中で以下に例示するような化学反応を実現することにより、5 つの基本関数以外にもプログラムに利用可能な関数の定義を拡張することが可能であろう。

また、コンピュータとしてプログラムの結果を返すためには、一連の関数反応の結果得られた出力を検出する必要がある。上記基本関数は、全て RNA を戻り値とするため、基本関数のみで構成されたプログラムの最終出力も RNA 分子となる。この出力 RNA は、分子生物学的手法により精製することが可能である。また RT-PCR やノーザン・ブロット、DNA マイクロアレイ等などの技術を使えば出力 RNA を検出することも可能である。しかし、本発明の分子コンピュータの特長は、自律的コンピューティングが可能である点であり、結果の検出までのステップを単一反応液内にて同時に行なえばより効果的である。したがって、コンピューティング反応液内で出

力された RNA 分子を直接検出することが望ましい。たとえば、RNA 分子を直接検出のために、Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 技術を応用することができる。FRET 技術は、蛍光を外部から検出して情報を取り出すことが可能であり、非常に有用である。蛍光標識した DNA プローブを用いることにより、FRET 技術をリアルタイム PCR 法などにも応用した例がある (Didenko, DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001 Nov;31(5):1106-16, 1118, 1120-1)。たとえば、図 9A に示す FRET プローブを使用すれば、蛍光出力関数として分子コンピュータの出力に応用可能である。Adjacent hybridization probes および Molecular beacon probe は、特定のターゲット配列が存在する場合に蛍光を返す特性を有するため、そのまま分子コンピュータの出力検出関数として利用することができるであろう (図 9A-a, b)。また、Hairpin probe は、DNA 伸長反応によりプライマーが二本鎖化した際に蛍光を発することから (図 9A-c)、基本関数 A のプライマー P1 もしくは基本関数 B のプライマー P2 の代替としてこの構造のプライマーを使用することにより、該当する経路が存在する場合にのみ蛍光を返す関数を構成することが可能である。

これらの蛍光出力関数を用いれば、出力の検出までを単一ステップで行なうことが可能な遺伝子診断プログラムなども設計することができる。たとえば、図 8C について、ニューラル・ネットワークによる遺伝子発現解析の結果は、x およ

び y の濃度を比較することにより行なわれるが、 x および y の各々を認識する蛍光プローブを異なる蛍光色素を用いて形成することにより出力の検出が可能となる。あるいは、「経路 $ST \rightarrow X$ が存在すれば x を返す関数」などの代わりにヘアピン・プローブを使用した蛍光出力関数「経路 $ST \rightarrow X$ が存在すれば蛍光を返す関数」などを構築することも考えられる。最終の出力ごとに異なる蛍光を割り当てれば、その蛍光強度を比較することによって出力の検出が可能となる。

その他の反応として、たとえば Wharam らが 2001 年に発表した 3-way junction (3WJ) 構造を利用したプライマーを使用してもよい(図 9B)。これは、ターゲット配列が存在する場合に、指定した配列の RNA を発現するというプライマーである。DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性と DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性が存在すれば反応が実現することから、本発明の情報処理方法に応用することもできる。特に、遺伝子のコード化反応などに使用することができる。

また、関数の拡張の例として、ある関数により出力された RNA を関数による演算に使用することもできる。たとえば、各関数により出力される RNA 分子自体もプライマーとして機能することができるので、これ自体を関数による演算の演算用核酸として機能させることもできる。

さらに、リボザイムを分子コンピュータの素子として利用する研究もある (Wickiser et al. Oligonucleotide Sensitive Hammerhead Ribozymes As Logic Gates. *Eighth International Meeting on DNA Based Computers*, 2002

June 10-13; Hokkaido University, Japan)。リボザイムは、酵素活性を有する RNA 分子として知られている。このようなリボザイムを使用すれば、関数の出力として生成された RNA 分子自体がリボザイムとして働き、その出力 RNA が直接新たな関数機能を発揮することができる。本発明の情報処理方法に使用する関数として、このようなリボザイムを使用することもできる。

以上に例示した基本関数以外の反応を本分子コンピュータのハードウェア中で実行することにより、コンピュータの機能がさらに拡張されるであろう。

上述したように、レトロウイルスがゲノム増幅に用いる反応活性として重要な RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性、DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性および RNaseH 活性の 4 種の反応を組み合わせ、自律的に稼動するプログラム可能な分子コンピュータを実現することができる。

具体的には、上記情報処理方法によって演算を行うための分子コンピュータとして、所望の関数による演算を行うための演算用核酸と、適切な反応液と、適切な酵素とを含む容器からなることを特徴とする分子コンピュータが提供される。分子コンピュータ上でプログラムを構成する要素となる関数として、便宜上 5 つの基本関数を定義したが、より一般化すると、プログラムとして分子コンピュータのハードウェア中に加えられるのは 3 種類のオリゴ核酸、即ち 5' 方向に配置されたプロモータを含む核酸と、3' 方向に配置されたプロモ

ータを含む核酸と、プロモータ配列を含まない核酸である。これらのオリゴ核酸が含まれる反応系に対して RNA による入力を与えると、オリゴ核酸の伸長反応が適宜進行し、ある点でプロモータ配列が二本鎖 DNA となるとその下流の配列が RNA として返されるというシステムであるともいえる。

一方、分子コンピュータに使用する容器としては、たとえば核酸の反応において通常使用されるサンプルチューブ、試験管、微細流路を使用することができる。また、使用する容器は、単一の容器であればよいが、複数の容器を使用してもよい。

また、容器として、細胞または組織などを使用すれば、生体細胞内において遺伝子の発現量およびパターンを自律的に検出し、その結果に応じて所望の遺伝子の転写を制御することもできる。したがって、生体細胞内で RNA の出力をコントロールすることが可能であり、新たな細胞コントロール機序を実現することができるであろう。たとえば、特定の発現パターンをもつ細胞のみで特定の遺伝子を発現させることが可能であり、癌細胞などターゲットとした細胞のみで細胞を正常化させるための遺伝子を発現させるにこともできる。このような技術は、遺伝子治療などの技術に応用可能である。

また、本発明の情報処理方法により情報処理を行うために、必要な演算用核酸をキットとして提供することもできる。該キットには、所望の関数による演算を行うための演算用核酸が含まれる。演算用核酸としては、第 1 の一本鎖核酸に対してプライマーとして作用する配列、プロモータ配列および任

意の核酸のプライマーとして作用する配列から選択される一以上の配列を有する核酸が含まれることが好ましい。

また、該キットには、演算用核酸だけでなく、適切な反応液と、適切な酵素とが含まれていてもよい。適切な反応液としては、たとえば、合成反応、増幅反応、逆転写反応、転写反応および分解反応に適したバッファーであり、適切な酵素は、たとえば、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素、DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有する酵素および RNaseH である。

上記キットは、たとえば上記（遺伝子発現プログラム）の節に記載したような遺伝子発現解析のためのキットであれば、コード化に必要な演算用核酸、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素、DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有する酵素および RNaseH、並びに適切な反応液として 40mM Tris-HCl (pH 8.0)、50mM NaCl、8mM MgCl₂、5mM DTT を含む。上記酵素は、予め反応液に添加されていてもよい。該キットは、たとえば 50℃にて全ての酵素を含むバッファー液に RNA サンプルを添加し、よく混ぜた後に、50℃でインキュベートして使用すればよい。たとえば、試験管 1 本あたり酵素バッファーを 3 μ l 添加して反応液の総液量を 25 μ l とし、反応時間は 30 分である。

また、プログラムの実行に必要な反応はレトロウイルスやレトロトランスポゾンが生体細胞内にて実際に行なっている反応と本質的に同一であることから、本システムによる分子

コンピュータが生体細胞内にて実現する可能性もある。この細胞内分子コンピューティングが実現すると、たとえば生体細胞内での遺伝子発現解析プログラムと蛍光出力関数との組み合わせにより、生きた細胞内の遺伝子発現パターンを外部から非破壊的にモニターする技術にも応用できる。

あるいは、細胞の活動をコントロールする遺伝子の RNA を出力することにより、遺伝子パターンに応じて細胞の活動をコントロールするプログラムを実現することもできる。たとえば、癌などの疾患マーカー遺伝子を入力とすることで、問題のある細胞内のみで導入した特定遺伝子を発現させるといった遺伝子治療を実現することもできる。

(発明の効果)

本発明の情報処理方法を使用することにより、プログラム可能な自律型分子コンピュータを作製することができる。このようなコンピュータは、同一ハードウェアを用いて異なるプログラムを実行できる汎用性を有する。特に、今後必要性がますます拡大すると考えられる遺伝子の機能解析に関する研究開発や遺伝子診断などの用途に応用することができる。

論理演算による遺伝子発現解析またはニューラル・ネットワークによる遺伝子発現解析を実行するプログラムを蛍光出力関数と組み合わせることにより、遺伝子の計測・解析および結果の出力を全て自律的行なうことが可能となる。また、上記ニューラル・ネットワークによる方法を使用すれば、遺伝子の発現パターンとフェノタイプとの関係が明らかでない場合でも、原理的に遺伝子発現解析が可能である。さらに、

遺伝子発現の濃度情報も評価することもできる。

(実施例)

(材料と方法)

(機器および試薬)

2本鎖 DNA 分子は、ゲル電気泳動を行った後、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) によって検出した。また、本方法の実施に使用した試薬は、DNA 500 LabChip^(R) kits または DNA 7500 LabChip^(R) kits である。リアルタイム PCR は、LightCyclerTM クイックシステム 330 (ロッシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を使用して行なった。該 PCR のための試薬は、同社より購入した LightCyclerTM FastStart DNA Master SYBR^(R) Green I を使用した。試薬の調整および機械の操作方法については、生産者のプロトコルに準じて行なった。

(遺伝子特異的配列の設計)

TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子の特異的に認識するプライマーは、三島隆らが開発した特異的プライマー設計プログラム (大規模遺伝子発現計測のためのプローブ及びプライマー配列設計法に関する研究、東京大学大学院理学系研究科修士論文 2001 年度) およびプライマー設計ソフトウェアとして公開されている Primer3 (Rozen and Skaletsky, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365-86) などを使用して設計し、作製したプライマーから適当なものを選んで使用した。使用した TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子

に特異的な配列を以下にまとめる。(なお、カッコ内の数字は、TGTP, Vitronectin 両遺伝子 RNA 分子上のプライマーの位置を表す。また S はセンス鎖配列、A はアンチセンス鎖配列であることを示す。

TGTP 特異的プライマー配列

配列名 ----- 配列

TGTP-S1 5' - CAGATATATATGGTCCCACC -3' (1302,

A) (配列番号 1)

TGTP-S2 5' - ACTTACTATCGCATGGCTTA -3' (1201,

S) (配列番号 2)

TGTP-AF 5' - CAGGATTTGAACATGTCTGTGGAT -3' (1051,

S) (配列番号 3)

TGTP-AR 5' - GCTTGTCTTCTAAGGACTCATCATTG -3' (1119,

A) (配列番号 4)

TGTP-PS 5' - GGGGATGAATTTCTACTTTG -3' (582,

S) (配列番号 5)

TGTP-PE 5' - AGAGTGAACACTGATTGGAA -3' (1364,

A) (配列番号 6)

Vitronectin 特異的プライマー配列

配列名 ----- 配列

Vitronectin-P1 5' - TTTGTCTCCAGAGAAGAAAT -3'

(1313, A) (配列番号 7)

Vitronectin-P2 5' - GCTAGGAACCTACAACAAC -3'

(1236, S) (配列番号 8)

Vitronectin-PS 5' - GTACCCCAAACCTTATCCAAG -3' (570,

A) (配列番号 9)

Vitronectin-PE 5' - GTAGGGAGGATTACAGAGT -3'

(1367, S) (配列番号 10)

必要に応じて、これらの配列の 5'末端にプロモータ配列およびコード配列などを追加したものをプライマーDNA として使用した。なお、原則として 30 塩基長未満のプライマーDNA の合成は、プロリゴ・ジャパン株式会社に E@sy Oligos^(R) として委託合成した。それ以上の長さのプライマーは、HPLC 精製品もしくは PAGE 精製品として株式会社サワディー・テクノロジーに合成依頼した。

(コード配列の設計)

本実施例では、人為的に作成された「コード配列」を含むオリゴ DNA を使用した。ここで、コード配列とは、nearest-neighbor 法による計算 (SantaLucia A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Feb 17;95(4):1460-5) により 2 本鎖 DNA の融解温度が均一に揃えられていること、安定した二次構造やミスハイブリッドの形成を起こしにくいように計算されていること等の特徴を有するように設計された同一塩基長の配列の組を指す (Yoshida et al "Solution to 3-SAT by breadth first search. *DIMACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science*, 2000 54: 9-22, American Mathematical Society)。ここでは、以下に示す 5 つの 25 塩基長の配列を使用した。

配列名-----配列

Code[1] 5' - TGAAGTCACCACAACACACAGTACA -3' (配列番号 11)

Code[2] 5' - GACAAACACCCCGAATACAAACAGC -3' (配列番号 12)

Code[3] 5' - AGTATCGAAGCGTGTGTCTGAAGAT -3' (配列番号 13)

Code[4] 5' - CAAAAGAGTTAGGATGGGAGCTGGA -3' (配列番号 14)

Code[5] 5' - TCGATATGGGTGGTACATGAGAGGT -3' (配列番号 15)

Code[6] 5' - CTCGCTCCTCTATTCATTCCTAG -3' (配列番号 16)

(コンピューティング反応に使用したプライマー配列)

コンピューティング反応には、遺伝子特異的配列およびコード配列、T7 プロモータ配列などを組み合わせた特殊なオリゴ DNA を使用した。それらの名称、構造および配列を以下に列挙する。(「構造」の項目で、[]は遺伝子特異的配列の配列名、< >はコード配列配列名、{T7}は T7 プロモータ配列を表す。Tg は 6 塩基長の配列 5'-GGGAGA-3'、Tc は 9 塩基長の配列 5'-ATAGGGAGA-3'のことである。またこれらの頭に`a'が付いているものは逆相補鎖配列を示す。S はその他の配列。

名称 : TGTP-P1

構造 : 5-S-a{T7}-S-[TGTP-S1]-3'

配 列 : 5' - CTGAGGTTATCTTGGTCTGGGGAGA

TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA CTGAGGTTATCTTGGTCTGGGG AGA
CAGATATATATGGTCCCACC -3' (配列番号 17)

名称 : TGTP-T21

構造 : 5' -a<Code[1]>-Tg-a<Code[2]>-a{T7}-[TGTP-S1]-3'

配列 : 5' - TGTACTGTGTGTTGTGGTGA CTTCA TCTCCC
GCTGTTTGTATTTCGGGGTGT TTGTC TCTCCCTATAGTG AGTCGTATTA
CAGATATATATGGTCCCACC -3' (配列番号 18)

名称 : Vitronectin-T32

構造 : 5' -a<Code[2]>-Tg-a<Code[3]>-a{T7}-[Vitronectin-
P1]-3'

配列 : 5' - GCTGTTTGTATTTCGGGGTGT TTGTC TCTCCC
ATCTTCAGACACACGCTTCGATACT TCTCCCTATAGTG AGTCGTATTA
TTTGTCTCCAGAGAAGAAAT -3' (配列番号 19)

名称 : aT21

構造 : 5' -Tc-<Code[2]>-aTg-<Code[1]>-3'

配列 : 5' - ATAGGGAGA GACAAACACCCCGAATACAAACAGC GGGAGA
TGAAGTCACCACAACACACAGTACA -3' (配列番号 20)

コメント : TGTP-T21 プライマーの 5'末端側と相補的な配列。

名称 : aT32

構造 : 5' -Tc-<Code[3]>-aTg-<Code[2]>-3'

配列 : 5' - ATAGGGAGA AGTATCGAAGCGTGTGTCTGAAGAT GGGAGA
GACAAACACCCCGAATACAAACAGC -3' (配列番号 21)

コメント : Vitronectin-T32 プライマーの 5'末端側と相補的な配列。

名称 : TGTP-PT

構造 : 5' - "GATGCA" - {T7} - [TGTP-PS] - 3'

配 列 : 5' - GATGCA TAATACGACTCACTATAGGGAGA
GGGGATGAATTTCTACTTTG - 3' (配列番号 22)

コメント : TGTP 遺伝子をインビトロ合成する際に使用した
プライマー。3'末端の 20 塩基は合成した TGTP の RNA 分子の
5'末端と同一の配列である。

名称 : Vitronectin-PT

構造 : 5' - "GATGCA" - {T7} - [Vitronectin-PS] - 3'

配 列 : 5' - GATGCA TAATACGACTCACTATAGGGAGA
GTACCCCAAACCTTATCCAAG - 3' (配列番号 23)

コメント : Vitronectin 遺伝子をインビトロ合成する際に使
用したプライマー。3'末端の 20 塩基は合成した
Vitronectin の RNA 分子の 5'末端と同一の配列である。

名称 : 20/aCode[1]

配列 : 5' - TGTACTGTGTGTTGTGGTGA - 3' (配列番号 24)

コメント : Code[1] 配列の 5'末端側 20 塩基配列で、コンピ
ューティング反応液中での T_m 値が 48℃程度となっている。

名称 : aC3-T45

構 造 : 5' - a<Code[5]>-aTg-a<Code[4]>-a{T7}-Tg-
<Code[3]> - 3'

配 列 : 5' - ACCTCTCATGTACCAACCCATATCGA TCTCCC
TCCAGCTCCCATCCTAACTCTTTTG TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
GGGAGA AGTATCGAAGCGTGTGTCTGAAGAT - 3' (配列番号 25)

名称 : aT45

構造 : 5' - Tc-<Code[4]>-aTg-<Code[5]>-3'

配列 : 5' - ATAGGGAGA CAAAAGAGTTAGGATGGGAGCTGGA GGGAGA
TCGATATGGGTGGTACATGAGAGGT -3' (配列番号 26)

コメント : aC3-T45 の 5'末端側と相補的な配列。

名称 : aC3-T465

構造 : 5' - a<Code[5]>- aTg-a<Code[6]>-aTg-a<Code[4]>-
a{T7}-Tg-<Code[3]>-3'

配列 : 5' - ACCTCTCATGTACCACCCATATCGA TCTCCC
CTAGGGAATGAATAGAGGAGCGGAG TCTCCC
TCCAGCTCCCATCCTAACTCTTTTG TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
GGGAGA AGTATCGAAGCGTGTGTCTGAAGAT -3' (配列番号 27)

名称 : aT465

構造 : 5' - Tc-<Code[4]>-aTg-<Code[6]>-aTg-<Code[5]>-
3'

配列 : 5' - ATAGGGAGA CAAAAGAGTTAGGATGGGAGCTGGA GGGAGA
CTCCGCTCCTCTATTTCATTCCCTAG GGGAGA
TCGATATGGGTGGTACATGAGAGGT -3' (配列番号 28)

コメント : aC3-T465 の 5'末端側と相補的な配列。

(RNA サンプルの調整)

コンピューティング反応に使用した TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子の RNA 分子、並びに Code[2,1]および Code[3,2] RNA 分子は、インビトロ転写法によって調整した。

TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子は、以下の手順で調製した。BALB/c マウスに、C57/BL10 マウス由来脾臓細胞を移植することにより移植片対宿主反応(GVHR)を誘発する。C57/BL10 マウス由来脾臓細胞は、東京大学医学部の徳永勝

士教授らより譲り受けた。次いで、移植後 2 日目の肝臓から total RNA を精製する。なお、このサンプルと同等のものが TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子の RNA を含むことは半定量リアルタイム PCR 法により確認されている (Wakui et al. 2001)。次いで、Total RNA をテンプレートとして逆転写反応を行い、TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子の cDNA を作成した。逆転写反応のプライマーとして、TGTP 遺伝子については TGTP-PE を、Vitronectin 遺伝子では Vitronectin-PE を使用した。逆転写反応の反応液は、50mM Tris-HCl (pH 8.3)、4mM DDT、10mM MgCl₂、100mM KCl、0.5mM dNTPs、800nM の各プライマーおよび 0.3 Units/ μ l の AMV Reverse Transcriptase XL (タカラバイオ株式会社) を使用し、これに total RNA を加えて反応を行った。なお、反応は、ホット・スタート法で行なった。具体的には、酵素を除く反応液 9.5 μ l を 65℃ で 5 分間インキュベートした後、50℃ にて酵素を含む 3 μ l の溶液を加えた。酵素を添加後、50℃ で 60 分間インキュベートした後 0.5 μ l の Ribonuclease H (2U/l; Invitrogen) を添加し、37℃ で 20 分間反応した。次いで、得られた cDNA をテンプレートとして PCR 反応を個別に行なった。TGTP については TGTP-PE および TGTP-PT を、Vitronectin については Vitronectin-PE および Vnct-PT を各々プライマー・ペアとして添加して反応を行った。ここで、TGTP-PT および Vitronectin-PT プライマーは、遺伝子特異的配列の TGTP-PS および Vitronectin-PS の 5' 末端に、それぞれ 6 塩基長のクランプ配列 (5'-GATGCA-3' (配

列番号 26))および 23 塩基長の T7 プロモータ配列 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAG A-3' (配列番号 27))を付加したオリゴ DNA である。PCR 反応には TaKaRa Ex TaqTM (タカラバイオ株式会社)を使用した。操作は、添付のプロトコル (Cool Start 法)に準じて行なった。簡単には、25 μ l の反応バッファー中に 0.8 μ lM の各プライマーDNA と、0.2mM の各 dNTP、40 U/ml の酵素と、1 μ l の cDNA サンプルとを加えて調整した溶液を、94°C-30 秒、60°C-90 秒、72°C-60 秒を 31 サイクル繰り返した後、さらに 72°C で 10 分間反応させた。なお、この反応により、TGTP については 831 塩基の 2 本鎖 DNA が得られ、Vitronectin については 846 塩基の 2 本鎖 DNA が得られるものと期待されるが、実際に得られた PCR 産物を電気泳動により検出したところ、期待される塩基長のシグナルが各々シングル・バンドで確認された (data not shown)。

上記 PCR 反応により得られた T7 プロモータ配列を含有する TGTP、Vitronectin 両遺伝子の 2 本鎖 DNA を使用したインビトロ転写を各々行ない、両遺伝子の RNA 分子を作成した。反応は各遺伝子について 100 μ l の反応液を 4 つの試験管に分けて行ない、各々について、40mM Tris-HCl (pH8.0)、8mM MgCl₂、2mM Spermidine-(HCl)₃、25mM NaCl、5mM DDT、0.4mM NTPs よりなる反応バッファーに 500U/ml T7 RNA Polymerase (Invitrogen)および 1 μ l の 2 本鎖 DNA テンプレートを加えた。37°C で 1 時間インキュベートした後に 1U/ μ l の Deoxyribonuclease I (Amplification Grade;

Invitrogen)を $2.5\mu\text{l}$ 添加し、さらに 37°C で 15 分間インキュベートした。得られた反応物はエタノール沈殿法により精製した。なおエタノール沈殿の際には Pellet Paint^(R) Co-Precipitant (Novagen)を用い、製品に添付の使用説明に添って実験操作を行なった。得られた沈殿物は DEPC 処理水に溶解したものを -20°C で保存して使用した。

Code[2,1]および Code[3,2] RNA 分子は、合成委託したオリゴ DNA の TGTP-T21 および Vitronectin-T32 を用いてインビトロ合成した。各々について、オリゴ DNA の 3'末端に相補的な 20 塩基長のプライマーとを PCR 反応液に混入し、 94°C で 5 分インキュベートした後に 80°C にて酵素を含むバッファーを投与、その後 60°C で 5 分、 72°C で 60 分間インキュベートした。ここで得られた T7 プロモータ配列を含む二本鎖 DNA を使用したインビトロ転写反応によりコード RNA を生成した。なお、転写反応、Deoxyribonuclease I 処理およびエタノール沈殿法の方法は、TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子の場合と同様である。

(コンピューティング反応)

DNA プライマーによる各種関数反応を実現するコンピューティング反応は、単一バッファー内に RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素および DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有する酵素を共存させ、同時に活性を持たせることにより実現されるものである。反応液の組成は 40mM Tris-HCl (pH 8.0)、 50mM NaCl、 8mM MgCl_2 、 5mM DTT および $0.3\text{ U}/\mu\text{l}$ AMV Reverse

Transcriptase XL (タカラバイオ株式会社)、 $0.04 \text{ U}/\mu\text{l}$ Ex TaqTM (タカラバイオ株式会社)、 $3.2 \text{ U}/\mu\text{l}$ Thermo T7 RNA Polymerase (TOYOBO)より成る。この反応液に適宜、DNA プライマーおよび RNA テンプレートを添加する。なお、特に断りがない限り、DNA プライマーは各々最終濃度 1nM で添加している。本反応はホット・スタート法で行ない、酵素を除いた反応液を 65°C で 5 分間インキュベートした。続いて 50°C にて全ての酵素を含むバッファー液を添加し、よく混ぜた後に、 50°C でインキュベートした。なお特に断りがない限り、試験管 1 本あたり添加した酵素バッファーは $3 \mu\text{l}$ であり、反応液の総液量を $25 \mu\text{l}$ とし、反応時間は 30 分である。反応後速やかに、転写酵素等の活性を失わせる目的で、 85°C で 10 分間インキュベートした。

(コンピューティン反応後の RNA 産物の検出)

コンピューティング反応後の RNA 生成物は、DNA を酵素で分解した後に逆転写-PCR を行なうことで検出した。

DNA の酵素分解に先立ち、DNA に結合することで酵素分解を妨げると考えられる Taq ポリメラーゼなどの酵素類を除去する目的でカラムによる精製を行なった。コンピューティング反応液に DEPC 処理水を加えて液量を $50 \mu\text{l}$ としたサンプルを、分画分子量 100,000 のカラム MICROCON YM-100 (Millipore)にのせて、 4°C 、12000rcf で 10 分間遠心した。カラムを通過した溶液を回収し、さらに、MICROCON YM-10 (Millipore, 分画分子量 10,000)にのせて 4°C 、12000RCF で 50 分間遠心した後、カラムを新しい試験管に逆さに乗せて

4℃, 12000RCF で 10 分間遠心し、カラムの上部に残った濃縮液を回収した。

DNA の分解は、20mM Tris-HCl (pH 8.4)、2mM MgCl₂、50mM KCl および 0.1U/ μ l Deoxyribonuclease I (Amplification Grade; Invitrogen) に上で回収されたサンプルを各々 1 μ l 添加した 10 μ l の反応液中で、室温で 15 分間反応させることにより行なった。反応後、25mM の EDTA を 1 μ l 加えた後に 65℃で 10 分間インキュベートした。

逆転写反応は 50mM Tris-HCl (pH 8.3)、4mM DDT、10mM MgCl₂、100mM KCl、0.5mM dNTPs および 0.3 Units/ μ l の AMV Reverse Transcriptase XL (タカラバイオ株式会社) よりなる溶液に、最終濃度 600nM のプライマーDNA と上で得られた DNase I 反応物を 1 μ l 加えた、試験管 1 本あたり 12.5 μ l の反応液中で行なった。なお反応はホット・スタート法で行ない、酵素を除いた組成物よりなる溶液を 65℃で 5 分間インキュベートした後に、バッファーに酵素を加えた溶液を加えた 3 μ l の溶液を 50℃にて添加した。その後 50℃で 1 時間反応させたのち、94℃で 10 分間インキュベートした。

得られた cDNA はリアルタイム PCR 法により定量分析した。生産者のプロトコルに添って調整した 20 μ l の反応液に逆転写反応産物を 1 μ l 加えて、94℃で 10 分間インキュベートした後に PCR 反応を実行した。PCR 反応は、コード配列および 300 塩基長未満の遺伝子配列を増幅する際には 94℃-3 秒, 60℃-10 秒, 72℃-5 秒のサイクルを 40 回繰り返すものとし、300 塩基長以上の遺伝子配列については 94℃-25 秒, 60℃-

10 秒, 72°C-25 秒のサイクルを 40 回繰り返すものとした。
なお、濃度の定量解析の際には、最終濃度が 0.1nM、0.03nM、0.01nM となるように調整した一本鎖 DNA を同時に反応させ、PCR 増幅曲線を機械に付属のソフトウェアを用いて比較することにより行なった。また、PCR 増幅産物をゲル電気泳動にて検出する際には、PCR 反応を適当な時点で停止し、その増幅途中の産物を Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて検出、解析した。

(コンピューティング反応の中間 DNA 産物の検出)

コンピューティング反応の進行を確認するため、反応液中にて生成される一本鎖および二本鎖 DNA よりなる中間産物の検出を行なった。

逆転写反応により生成される一本鎖もしくは二本鎖 DNA の検出の際には、サンプルを精製後に PCR 反応で増幅することにより行なった。コンピューティング反応液に DEPC 処理水を加えて液量を 50 μ l としたサンプルを、分画分子量 100,000 のカラム MICROCON YM-100 (Millipore)にのせて、4°C, 12000rcf で 10 分間遠心した。カラムを通過した溶液を回収し、さらに、MICROCON YM-100 (Millipore, 分画分子量 10,000)にのせて 4°C, 12000RCF で 50 分間遠心した後、カラムを新しい試験管に逆さに乗せて 4°C, 12000RCF で 10 分間遠心し、カラムの上部に残った濃縮液を回収した。ここで得られた液に対して、適当なプライマーおよび Ex Taq^(R) (タカラバイオ株式会社)をバッファーに添加した反応液中で PCR 反応を行ない、一本鎖 DNA の増幅を行なった。増幅は

cool start 法で行ない、94℃-30 秒、60℃-60 秒、72℃-60 秒のサイクル 31 回の後に、さらに 72℃で 10 分間インキュベートした。得られた増幅産物はゲル電気泳動により検出した。

DNA 二本鎖反応により形成される二本鎖 DNA の検出の際には、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) によるゲル電気泳動を行なった。二本鎖 DNA の塩基長および濃度の計測は、装置のプロトコルに準じて行なった。

結果

(ハードウェアの開発)

レトロウイルスのゲノム増幅システムにおける反応を模した分子コンピュータを実際に試験管内にて実現するために、第一に分子コンピュータの実現に必要な化学反応を全て実現する反応液の条件検討を行なった。この反応液は、分子コンピュータを構成するハードウェアとなる重要なものである。

ここで用いるハードウェアは、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性および DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性と、さらに RNaseH 活性とが、一定温度に保たれた単一試験管内にて同時に実現する必要がある。同様な反応液は核酸増幅技術である 3SR (Guatelli et al. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Oct;87(19):7797)において実現されていたので、この反応条

件に沿って実験を行なった。しかしながら 3SR やこれに類似する技術での反応条件は 37℃ から 42℃ という、PCR 反応におけるアニーリング温度などと比較すると低い温度設定となっており、実際にこの条件で実験したところ、逆転写反応および DNA 二本鎖化反応に用いるプライマー DNA の特異性を確保することが困難であり、特にターゲットが存在しないプライマーがダイマーを形成しやすいほか、非特異的な反応が期待される反応を抑制することが明らかとなった (data not shown)。

本分子コンピュータではプライマー DNA によりプログラムを入力するため、このような性質はハードウェアとしては不適當であることから、プライミングの特異性を上げるために反応温度を高く設定することを考えた。3SR では酵素として AMV 逆転写酵素、T7 RNA ポリメラーゼおよび RNaseH 用いるが、T7 RNA ポリメラーゼと RNaseH は反応温度を高く設定すると活性を失う。そのため、高い反応温度条件下で DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を示す酵素として Thermo T7 RNA Polymerase (TT7; TOY0B0) を、また RNaseH 活性を示す酵素として *Thermus thermophilus* RibonucleaseH (*Tth* RNaseH; TOY0B0) を用いて検討を行なった。酵素が活性を持つと確認されている反応温度は、AMV 逆転写酵素が 65℃ 以下、TT7 は 50℃ 以下、*Tth* RNase H は 90℃ 以下であった。いずれも低温度では 37℃ 程度まで活性が確認されており、ここではより高温での反応条件が望まれたことから、反応条件の検討は 50℃ 以上にて行なった。

50℃から 62℃の各反応温度において、耐熱性酵素を使用した反応条件下で各反応活性のアッセイを行なったところ、RNA 依存 DNA ポリメラー活性は 50℃～58℃ではほぼ一定しているが(図 10)、DNA 依存 RNA ポリメラー活性は 50℃より温度が上がるに従って急激に活性が低下することが明らかとなり(図 11)、反応温度を 50℃以上に設定するのは困難であると考えられた。さらに DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性も温度に応じて低下するが、これは Taq DNA ポリメラーゼを添加することにより改善されることが実験的に示された(図 12)。ところで、AMV 逆転写酵素は、一本鎖の RNA 鎖あるいは DNA 鎖を鋳型とした DNA ポリメラーゼ活性をもつほか、DNA-RNA ハイブリッドから RNA 鎖を除去する RNase H 活性も有することが知られており(Baltimore et al. 1972, Champoux et al. 1984, Verma 1977)、さらに Taq DNA ポリメラーゼはエキソヌクレアーゼ活性を持つことが知られている。これらの酵素を用いる際には RNaseH は特に無くても反応が進行することが、実験的にも明らかとなった(data not shown)。

以上の検討結果をもとに、ハードウェアとしては AMV 逆転写酵素および TT7 RNA ポリメラーゼ、Taq DNA ポリメラーゼにより構成される反応液を用い、50℃の一定温度に保たれた反応条件においてコンピューティング反応を行なうものとした。

(プライマー伸長反応の特異性評価)

コンピューティング反応では、RNA および DNA を鋳型としたプライマー伸長反応によってデータの入力や演算などを行

なう。そのためプライミングの特異性が確保されていることは非常に重要である。ここでは、移植片対宿主反応 (GVHR) が引き起こされる際に遺伝子発現が上昇することが知られている TGTP/Mg21 遺伝子 (以下、TGTP 遺伝子と表記) および Vitronectin 遺伝子について、インビトロ合成した両遺伝子断片をターゲットとして、特異的に設計されたプライマーの逆転写反応におけるプライマー伸長反応の活性および特異性を評価する実験を行なった。

TGTP-P1 は、TGTP 遺伝子の特異的な配列 TGTP-P1 を 3' 末端に持のプライマーである。このプライマーの伸長活性および特異性を評価するために、このプライマーと TGTP 遺伝子とを混和して 15, 30 および 45 分間のコンピューティング反応を実行し、さらにそこで形成されたプライマー伸長産物を PCR 反応で増幅 (図 13-(a)) した際の反応生成物をゲル電気泳動で確認したところ、期待される 842bp の位置にバンドが確認された (図 14, レーン 1~3)。同様な実験を、TGTP 遺伝子の変わりに Vitronectin 遺伝子を用いて行なったところ (図 13-(b))、バンドは確認されなかった。なお、PCR 反応による増幅の際には、伸長させたプライマーと、鋳型として加えた両 RNA 分子の 5' 末端を含むプライマー (TGTP-PT および Vitronectin-PT) とをプライマー・ペアとして加えた (A)。このため、ミス・プライミングにより伸長して精製された cDNA もこの方法で検出されると考えられる。この結果から、プライマー TGTP-P1 は、少なくとも TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子の中においては、TGTP 遺伝子上のターゲット

ット部位に特異的に結合して伸長反応を引き起こすことが確認された。

同等な実験を Vitronectin 遺伝子 RNA に特異的なプライマーである Vitronectin -P1 を用いて行なったところ、Vitronectin 遺伝子が存在する場合にのみ、期待される 792bp にピークが認められた(レーン 7~12)。これより、このプライマーもターゲット部位とのみ特異的にプライミングを起こすことが確認される。ただし一部にスメア状のシグナルも確認されることから、若干非特異的な反応も起きているものと考えられる。

以上の結果より、TGTP-P1 および Vitronectin-P1 プライマーは、本ハードウェア中で特異的プライマーとして利用できることが確認された。また、同等な実験を 37℃ の反応条件で行なった際には、プライマー・ダイマーと考えられるバンドや非特異的なスメアが強く検出されていたことから(data not shown)、ここで開発した 50℃ の反応条件がより適当であることが改めて示された。

(コード化関数の実行)

コード化関数とは、特定の RNA 分子が存在する場合に対応するコード RNA を生成するものである。遺伝子発現解析プログラムを実現する際に、まず重要となるのがこのコード化関数の実行である。ここでは TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子 RNA に対するコード化関数を設計し、それを使用した実験を行なった。

TGTP コード化関数の構造を図 2-5A に示す。これは基本関

数 A (図 6A 参照)を元として、引数として TGTP 遺伝子上の配列の aTGTP-S1 (TGTP-S1 の相補鎖配列)および TGTP-S2 を、戻り値として Code[2,1]配列を設定したものとなっている (Path (aTGTP-S1 → TGTP-S2) ⇒ Code[2,1])。すなわち、第 1 鎖 cDNA 合成に関わるプライマー(P1)は配列 TGTP-S1 のほか T7 プロモータ配列およびコード配列を含み、第 2 鎖 cDNA 合成に関与するプライマー(P2)は配列 TGTP-S2 よりなる。TGTP 遺伝子 RNA が存在すると P1 が逆転写反応を起こし、さらに S2 による第 2 鎖合成反応が起きて T7 プロモータ配列が二本鎖 DNA となることにより Code[2,1]配列 RNA (Code[2] と Code[1]配列とが Tg 配列を挟んで並んだもの) が転写されるものと期待される。なお、T7 転写酵素の転写開始点はプロモータ配列中にあり、出力されるコード RNA の 5'末端には Tg 配列 (5'-GGGAGA-3')が常に付加されと考えられる。また、P1 の 5'末端の配列が一本鎖 DNA の状態だと、出力されたコード RNA が未反応の P1 と結合して DNA-RNA ハイブリッドを形成し RNaseH 活性により分解されてしまう可能性が考えられ、また実際に P1 を一本鎖のまま反応させると出力 RNA が検出されなかったことから (data not shown)、P1 の 5'末端配列 (コード配列の相補鎖部分およびプロモータ配列の一部)に相補的なオリゴ DNA をあらかじめハイブリダイズさせて二本鎖 DNA としておくことが効果的であると考えられた。

ここで示した TGTP 遺伝子コード化関数を実行するため、P1 として TGTP-T21 および aT21 オリゴ DNA のハイブリッド

を、P2 として TGTP-S2 を用いてコンピューティング反応液中で実行し、出力されたコード配列 Code[2,1]の RNA を定量する実験を行なった(図 16)。コード配列 RNA は、コンピューティング反応産物を DNaseI 処理した後に逆転写反応、リアルタイム PCR 反応することで検出した。TGTP を投与した場合(白丸)にはコード配列 RNA の増加が確認されるのに対し、TGTP が存在しない場合(斜線丸)では時間を追っても変化が見られなかった。なお、検出反応での DNaseI 処理が不十分だと P1 上のコード配列が検出されてしまう可能性も考えられたため逆転写反応時に酵素を添加しない実験も行なったが(白四角および黒四角)、その場合はほとんどコード配列は検出されず、バックグラウンドは十分に低いといえる。以上より、TGTP 遺伝子コード化関数が本コンピューティング反応液中で確かに活性を有することが確認された。なお、コード配列 RNA は反応時間 40 分程度をピークとしてその後は徐々に減少しているが、その理由としては時間の経過に伴って RNA 合成反応活性が低下し、RNA 分解反応がこれを上回ってしまうことが考えられる。ここで入力した TGTP 遺伝子 RNA の濃度は 0.17nM であり、またこの定量結果をもとにコンピューティング反応液中のコード配列 RNA 産物濃度を計算すると、反応時間 36 分産物で 1.58nM となった。同等な実験を複数回行なったところ(data not shown)、30 分から 60 分のコンピューティング反応で、コード配列 RNA の出力は TGTP 遺伝子の一倍から数十倍程度得られた。

さらにコード化関数の反応特異性を評価する実験を行なっ

た。TGTP 遺伝子コード化関数に対して、TGTP 遺伝子 RNA、Vitronectin 遺伝子 RNA およびネガティブ・コントロールとして同量の水(N.C.)を加えて 30 分間コンピューティング反応を実行し、その産物として得られたコード配列 RNA の濃度を測定した(図 17C)。この結果としては TGTP 遺伝子サンプルが与えられた時のみコード配列の出力が得られることが期待されるが、ここでは Vitronectin 遺伝子を投与した場合でもコード配列のシグナルが認められた。また、同様な実験を Vitronectin 遺伝子コード化関数についても行なったところ、こちらでも特異性は認められなかった(図 17D)。

(複数 RNA 分子にまたがる経路の逆転写反応と演算反応)

本分子コンピュータ上で論理演算やニューラル・ネットワークによる遺伝子発現解析プログラムなどを実行する際には、複数の RNA 分子で構成される経路を逆転写する反応が必須となる。複数の RNA で構成される経路の逆転写反応とは、プライマーが第 1 の RNA 分子にプライミングして逆転写反応を起こし、そこで形成された cDNA の 3'末端がさらに第 2 の RNA 分子にプライミングする、というプロセスであり、この実行には RNaseH 活性による第 1 の RNA 分子の除去が重要となる。

ここでは、図 18 に示すようにインビトロ合成した Code[2,1]および Code[3,2] RNA 分子、および Code[1]配列と相補的な 20/aCode[1]プライマーを用いることで、2 つの RNA 分子にまたがる Code[1]→Code[2]→Code[3]なる RNA 上の経路を逆転写する反応の評価を行なった。コンピューティング反応液に 20/aCode[1]プライマーと RNA サンプルを投

与して 0 分、15 分および 30 分間反応させ、形成された cDNA 産物を PCR 増幅してゲル電気泳動にて確認したところ、Code[2,1]および Code[3,2] RNA 分子を投与して 15 分以上反応させた場合に、期待される cDNA の形成が確認された(図 19)。

複数の RNA 分子上をたどる逆転写反応が実現することが確認されたことから、この経路を引数とする関数として基本関数 B より「Path (Code[1] -# Code[3]) => Code[4,5]」なる関数を構築した (図 20)。この関数は、TGTP 遺伝子を引数として Code[2,1]を返す関数、および Vitronectin 遺伝子を引数として Code[3,2]を返す関数と組み合わせることにより、TGTP 遺伝子と Vitronectin 遺伝子が共に存在する場合にのみ Code[4,5]を返す、「TGTP $\wedge$ Vitronectin $\Rightarrow$ code[4,5]」なる論理演算プログラムが実現することが期待された(図 7 参照)。ここでは図 19 の実験で使った RNA サンプルを用いて、Code[2,1]および Code[3,2] RNA 分子が共に存在する場合にのみ Code[1]で開始し Code[3]で終結する経路が実現されて Code[4,5] RNA 分子を返す反応を評価する実験を行なった。関数には、P1 に図 19 の実験と同様に 20/aCode[1]を、P2 には aC3-T45 と aT45 とをハイブリダイズさせたものを使用した。その結果、Code[2,1]、Code[3,2] RNA 分子を両方投与した場合においても Code[4,5]の有意な発現は認められなかった(図 21)。コード配列 RNA 分子と 20/aCode[1]プライマーの代わりに Code[3]の相補鎖配列オリゴ DNA を直接投入する実験を別途行なったところ

Code[4,5]の発現が認められたことから (data not shown)、反応効率や特異性に問題があったものと考えられる。

(センス鎖 RNA 増幅関数の実行)

基本関数 C: Amplify (a -# b) を用いて、TGTP 遺伝子の配列を増幅する関数を設計し、実験により反応の確認を行った。

TGTP-PT は TGTP 遺伝子 RNA をインビトロ合成した際に使用したプライマーであるためこのプライマーの 3'末端に配置された配列 TGTP-PS は TGTP 遺伝子 RNA の 5'末端と同一であり、さらにその 5'末端側に T7 プロモータ配列を含む。また、TGTP-AR プライマーは、インビトロ合成 TGTP 遺伝子 RNA の 538 塩基より始まる 26 塩基長の部分の逆相補鎖配列よりなる。これら TGTP-PT および TGTP-AR 両プライマーを組み合わせると「Amplify (aTGTP-AR -# TGTP-PS)」なる、TGTP 遺伝子を引数とする遺伝子増幅関数が構成され、これに TGTP 遺伝子 RNA が渡されると配列 TGTP-PS および TGTP-AR で囲まれた部分のセンス鎖 RNA 配列が増幅されると期待された(図 22)。

この TGTP 遺伝子センス鎖 RNA 増幅関数に対して、インビトロ合成した TGTP 遺伝子あるいは Vitronectin 遺伝子を与えた場合と同量の水を与えた場合(N.C.)について 0, 15 および 30 分のコンピューティング反応を実行し、その RNA 産物を検出する実験を行った。検出は、コンピューティング反応産物を DNaseI 処理することでプライマーDNA や反応中間体 DNA を除去した後に、TGTP-AR プライマーを使用した逆転

写反応とそれに続く TGTP-AR, TGTP-PT 両プライマーを使用した PCR 反応で増幅し、ゲル電気泳動することにより行なった(図 23, レーン M:マーカー)。この方法により、TGTP-AR および TGTP-PT の非特異的な反応により生成された RNA 分子も検出されると考えられた。TGTP 遺伝子 RNA の増幅産物が存在する場合はこの RT-PCR により 592 塩基長の二本鎖 DNA が検出されると期待されるが、そのバンドは反応時間によって増加しており、A の反応でターゲットとした RNA 分子が増幅されていることが確認された(レーン 1~3)。ただしポジティブ・コントロール(レーン P)と比較すると 592bp のバンドの下にスメア状のシグナルが検出されていることから、若干ではあるが非特異的な反応も起きている可能性もある。また Vitronectin 遺伝子 RNA を加えた場合や(図 23 レーン 4~6)、等量の水のみを与えた場合(N.C.; 図 23 レーン 7~9)については、全くシグナルが検出されていない。100bp 未満に見られるスメア状のシグナルは PCR 反応時にサンプルの変わりに等量の水を加えた場合(レーン N)にも認められていることから、PCR 反応において形成されたプライマー・ダイマーであると考えられる。

考察

レトロウイルスのゲノム増幅反応を模した分子コンピュータを *in vitro* の反応系で実装する目的で研究を行なった。この分子コンピュータのハードウェアとしては、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性および DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性と、さらに RNaseH 活性と

が共存することが必要であり、さらに正確にコンピューティング反応が実行されるために各反応について特異性が十分に確保されていることが必須となった。ここではその条件を満たす反応条件を新規に開発し、これをハードウェアとして採用して実験を行なった。

このハードウェアを用いて遺伝子コード化反応を行なったところ、単一温度条件下で 30～40 分程度という短時間反応させることで、確かにコード配列 RNA の生成が確認された。これは非常に簡便な遺伝子コード化技術として遺伝子発現計測への活用が考えられるほか、遺伝子発現解析などさらに高次な分子コンピュータのプログラムへの入力として利用できると考えられた。TGTP 遺伝子および Vitronectin 遺伝子のコード化関数で使用した第一プライマー (P1) の遺伝子特異的配列部位は、いずれも図 2-4 でプライマー伸長の特異性を確認したものであることから、そのプライミングのターゲット特異性に問題があるとは考えにくい。さらに Amplify 関数でもターゲット特異性に問題は見られなかった。遺伝子コード化反応について十分な特異性が得られない理由としては、プライマー・ダイマーの形成や遺伝子 RNA との非特異的な反応が影響している可能性が高いと考えられる。ここで使用したコード化関数は、プロモータ部位が二本鎖化されるとターゲット遺伝子を認識した場合と同一のコード配列 RNA を出力してしまうため、何らかの非特異的反応により P1 上のプロモータ配列が二本鎖化されると、本来の出力と区別できない RNA を誤って転写してしまう可能性が内在するのである。

そこで、両コード化関数のプライマーおよび遺伝子 RNA が形成するハイブリッドの構造および安定性を計算したところ、両コード化関数の P1 について、プロモータ P2 および遺伝子 RNA が P1 のプロモータ配列と安定なハイブリッドを形成したり、遺伝子 RNA 断片が非特異的プライマーとして機能したりする可能性が示された (data not shown)。コード化関数で用いるプライマーは、ターゲット特異的配列に T7 プロモータ配列を加えた長い一本鎖 DNA 部分が含まれるため非特異的なハイブリッドが起こりやすい上に、プライマー・ダイマーなどの形成によりプロモータ配列が二本鎖化されると誤ってコード配列 RNA を出力してしまうため、配列の設計には特に注意を払う必要があると考えられる。さらに、ここで報告したレトロウイルス型分子コンピュータに用いる関数は添加されるオリゴ DNA で定義されるもので、同一反応液中に複数のプライマーを添加することにより原理的に複数の関数を同時に実行することが可能となる。これにより遺伝子の発現解析などより複雑なプログラムが実現しうるが、同一反応液中に多数の関数を共存させると反応液中に加えるオリゴ DNA の種類もそれに応じて増大し、非特異的な反応の問題はさらに大きくなる。そのため、高度なプログラムを構築する際には適切な核酸の配列設計する技術の開発が望ましい。たとえば、上述した正規直交化配列とすることが好ましい。

本研究により、レトロウイルス型分子コンピュータを実装するために必要となる反応が *in vitro* にて実現しうることを示された。さらに、本研究でターゲットとした TGTP 遺伝

子および Vitronectin 遺伝子は、移植手術後に移植片対宿主反応 (GVHR) の遺伝子診断を行なうためのマーカー遺伝子として利用が期待されるものである。今回はこれらの遺伝子を引数とするコード化関数と、その出力を受け取って演算関数を実行する関数で構成される遺伝子発現解析プログラムを設計し、さらにこの反応の一部が確かに実行されることが実験的に示された。この分子コンピュータのシステムを用いることにより、単一試験管内で一定温度条件下での反応を実行させる操作を行なうだけで、試験管内の各分子が自律的に複数遺伝子の発現パターンを解析してその結果を出力する技術が確立されると期待され、簡便で正確な遺伝子診断技術としての応用が期待される。さらに将来的には、生体細胞内にて同様の分子コンピュータ・システムを実行するための研究へと発展することも期待され、本研究成果により分子コンピュータ研究に新たな方向性が示されたといえる。

(複数の関数の多層化)

本分子コンピュータでは、ある関数の戻り値を他の関数の引数とすることが考えられる。ここでは、Vitronectin 遺伝子が存在する場合に Code[3,2]配列 RNA を出力するコード化関数と、その関数の戻り値が存在する場合に Code[4,6,5]配列 RNA を出力する関数とにより構成されるプログラムが、単一のコンピューティング反応液中にて動作することを確認する実験を行なった。ここでの反応の概略を図 24 に示す。本実験では、このプログラムに対する入力として Vitronectin 遺伝子を加えた場合 (Vitronectin +) と、Vitronectin 遺

伝子は加えずに同量の水のみを加えた場合 (Vitronectin -) についてコンピューティング反応を実行し、結果として得られた RNA 産物を検出した。検出は、Code[4, 6, 5]配列を、Code[4] , Code[5]に対するプライマーペアを用いたリアルタイム PCR 法により行なった。その結果を図 25 に示す。RNA 産物検出時において、逆転写反応時に通常濃度の酵素を添加したサンプル (RT+; 白棒) と、酵素は添加しなかったサンプル (RT-; 黒棒) とに分けて実験したところ、Vitronectin RNA を入力として与えた場合では RT+のサンプルは RT-と比較して非常に高いレベルで出力が検出されたが (Vitronectin +)、入力を与えなかった場合には RT+と RT-とはほとんど出力のレベルに変化はなかった (Vitronectin -)。ここで RT-サンプルより得られた出力は実験上のバックグラウンドであり、RT+と RT-における検出結果の差が出力として得られた RNA 分子の量を反映するものと考えられる。また、上の反応産物について、図 24 に示すプログラムの中間産物である Code[3, 2]RNA についても同様に検出反応を行なったところ、Vitronectin を与えたときに確かに Code[3, 2]の濃度も上昇していることが確かめられた (図 26, 白棒: RNA+, 黒棒: RNA-)。

以上の結果から、図 24 に示した 2 種類の関数よりなるプログラムは確かに実行され、複数の関数を単一のコンピューティング反応液中にて組み合わせて実行することが可能であることが示された。関数を多層に重ねることにより複雑なプログラムが実現することと考えられることから、このように関

数の戻り値が実際に他の関数の引数となることは重要である。

請 求 の 範 囲

1. 分子の化学反応により、引数を受け取り戻り値を返す関数による演算を行う情報処理方法であって、

(a) 分解可能な第1の一本鎖核酸に対応付けて定義された第1の符号化核酸を引数として入力し、

(b) 前記引数に基づき、演算用核酸の化学反応に対応付けて定義された関数による演算を行い、

(c) 第2の一本鎖核酸に対応付けて定義された第2の符号化核酸を戻り値として得ること、

を特徴とする情報処理方法。

2. 請求項1に記載の情報処理方法であって、前記第2の一本鎖核酸は、分解可能な核酸である方法。

3. 請求項2に記載の情報処理方法であって、前記(c)で得られた第2の符号化核酸を、さらなる関数における第1の符号化核酸として使用して演算を行い、さらなる第2の符号化核酸を戻り値として得ることを含む情報処理方法。

4. 請求項2に記載の情報処理方法であって、前記関数による演算を複数機能させることにより、戻り値としての第2の符号化核酸を得ることを含む情報処理方法。

5. 請求項4に記載の情報処理方法を使用して、前記関数、引数および戻り値の組合せにより記述されたプログラムに従って、複数の関数による演算を行うことにより前記プログラムの計算結果を導出する情報処理方法。

6. 請求項1に記載の情報処理方法であって、

前記(a)の入力は、前記第1の一本鎖核酸を、前記演算

用核酸と適切な酵素を含む反応液中に添加することであり、

前記 (b) の演算は、前記演算用核酸と前記適切な酵素と前記第 1 の一本鎖核酸を化学反応させることであり、

前記 (c) の戻り値は、前記化学反応の反応産物として得られること、

を特徴とする情報処理方法。

7. 請求項 6 に記載の情報処理方法であって、

前記第 1 の一本鎖核酸および第 2 の一本鎖核酸は RNA であり、

前記化学反応は、合成反応、増幅反応、逆転写反応、転写反応、分解反応であり、それぞれ DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素による合成反応または増幅反応、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素による逆転写反応、および DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有する酵素による転写反応、および RNaseH による分解反応である情報処理方法。

8. 請求項 7 に記載の情報処理方法であって、前記演算用核酸は、前記第 1 の一本鎖核酸に対してプライマーとして作用する配列、プロモータ配列および任意の核酸のプライマーとして作用する配列から選択される一以上の配列を有することを特徴とする情報処理方法。

9. 請求項 8 に記載の情報処理方法であって、

前記関数は、配列 a より始まり配列 b を通過する経路を有する RNA を引数として入力したときに、指定した配列 x の RNA を戻り値として返す関数であり、

前記演算用核酸は、5'末端方向のプロモータ配列と、その下流に x の逆相補配列と、その 3'末端側に a の相補配列とを有する第 1 の演算用核酸、並びに配列 b を有する第 2 の演算用核酸の 2 つであり、

前記化学反応は、前記第 1 の演算用核酸の a の相補配列から前記 RNA の逆転写反応が起こり、次いで、逆転写された一本鎖 DNA に前記第 2 の演算用核酸の配列 b が結合して該第 2 の演算用核酸の 3'末端から第 2 鎖 DNA の合成反応が起こり、次いで、該第 2 鎖 DNA と前記第 1 の演算用核酸のプロモータ配列が二本鎖化されることにより、該プロモータ配列の下流に配置された配列 x の転写反応が起こり、反応産物として配列 x の RNA 分子が合成される反応である情報処理方法。

10. 請求項 8 に記載の情報処理方法であって、

前記関数は、配列 a より始まり配列 b で終結する経路を有する RNA を引数として入力したときに、指定した配列 x の RNA を戻り値として返す関数であり、

前記演算用核酸は、配列 a を有する第 1 の演算用核酸、並びに 5'末端方向のプロモータ配列と、その下流に配列 x と、その 3'末端側に配列 b とを有する第 2 の演算用核酸の 2 つであり、

前記化学反応は、前記第 1 の演算用核酸の配列 a から前記 RNA の逆転写反応が起こり、次いで、逆転写された一本鎖 DNA に前記第 2 の演算用核酸の配列 b が結合して該一本鎖 DNA の 3'末端からさらなる合成反応が起こり、次いで、前

記第 2 の演算用核酸のプロモータ配列が二本鎖化されることにより、該プロモータ配列の下流に配置された配列 x の転写反応が起こり、反応産物として配列 x の RNA 分子が合成される反応である情報処理方法。

11. 請求項 8 に記載の情報処理方法であって、

前記関数は、配列 a より始まり配列 b を通過する RNA を引数として入力したときに、該 RNA または該 RNA に任意の配列が付加された RNA を戻り値として返す関数であり、

前記演算用核酸は、a の相補配列と、任意に配列 q の相補配列とを有する第 1 の演算用核酸、並びに 3'末端方向のプロモータ配列と、任意にその 3'末端側に配列 p と、その 3'末端に配列 b とを有する第 2 の演算用核酸の 2 つであり、

前記化学反応は、前記第 1 の演算用核酸の a の相補配列から前記 RNA の逆転写反応が起こり、次いで、逆転写された一本鎖 DNA に前記第 2 の演算用核酸の配列 b が結合して該一本鎖 DNA の 3'末端からさらなる合成反応が起こり、次いで、前記第 2 の演算用核酸のプロモータ配列が二本鎖化されることにより、該プロモータ配列の下流に配置された配列の転写反応が起こり、反応産物として前記 RNA 分子または任意に配列 p もしくは配列 q が付加された前記 RNA 分子が合成される反応である情報処理方法。

12. 請求項 8 に記載の情報処理方法であって、

前記関数は、配列 a より始まり配列 b を通過する経路を有する RNA を引数として入力したときに、該 RNA の逆相補配列を有する RNA または該 RNA の逆相補配列に任意の配列が

付加された RNA を戻り値として返す関数であり、

前記演算用核酸は、3'末端方向のプロモータ配列と、任意にその3'末端側に配列 p と、その3'末端に a の相補配列とを有する第 1 の演算用核酸、並びに配列 b と、任意にその3'末端に配列 q とを有する第 2 の演算用核酸の 2 つであり、

前記化学反応は、前記第 1 の演算用核酸の a の相補配列から前記 RNA の逆転写反応が起こり、次いで、逆転写された一本鎖 DNA に前記第 2 の演算用核酸の配列 b が結合して該第 2 の演算用核酸の 3'末端から合成反応が起こり、次いで、該 DNA と前記第 1 の演算用核酸のプロモータ配列が二本鎖化されることにより、該プロモータ配列の下流に配置された配列 x の転写反応が起こり、反応産物として前記 RNA の逆相補配列を有する RNA 分子または任意に配列 p もしくは配列 q が付加された前記 RNA の逆相補配列を有する RNA 分子が合成される反応である情報処理方法。

13. 請求項 8 に記載の情報処理方法であって、

前記関数は、引数としての RNA を必要とせず、常に配列 x の RNA を戻り値として返す関数であり、

前記演算用核酸は、3'末端方向のプロモータ配列と、その下流に配列 x とを有する第 1 の演算用核酸、および 5'末端方向のプロモータ配列と、その下流に x の相補配列とを有する第 2 の演算用核酸であり、

前記化学反応は、前記第 1 の演算用核酸と前記第 2 の演算用核酸が結合することにより、該プロモータ配列の下流に配置された配列 x の転写反応が起こり、反応産物として配列 x

の RNA 分子が合成される反応である情報処理方法。

14. 請求項 8 に記載の方法に従って複数の関数による演算を行うことにより前記プログラムの計算結果を導出する情報処理方法。

15. 核酸分子を使用して情報処理を行うためのキットであって、所望の関数による演算を行うための演算用核酸を含むことを特徴とするキット。

16. 請求項 15 に記載のキットであって、前記演算用核酸は、前記第 1 の一本鎖核酸に対してプライマーとして作用する配列、プロモータ配列および任意の核酸のプライマーとして作用する配列から選択される一以上の配列を有する核酸であるキット。

17. 請求項 15 に記載のキットであって、さらに適切な反応液と、適切な酵素とを含むことを特徴とするキット。

18. 請求項 17 に記載のキットであって、前記適切な反応液は、合成反応、増幅反応、逆転写反応、転写反応および分解反応に適したバッファーであり、前記適切な酵素は、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素、DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有する酵素および RNaseH であるキット。

19. 請求項 1 に記載の情報処理方法によって演算を行うための分子コンピュータであって、所望の関数による演算を行うための演算用核酸と、適切な反応液と、適切な酵素とを含む容器からなることを特徴とする分子コンピュータ。

20. 請求項 19 に記載の分子コンピュータであって、前記

演算用核酸は、前記第 1 の一本鎖核酸に対してプライマーとして作用する配列、プロモータ配列および任意の核酸のプライマーとして作用する配列から選択される一以上の配列を有する核酸であり、前記適切な反応液は、合成反応、増幅反応、逆転写反応、転写反応および分解反応に適したバッファーであり、前記適切な酵素は、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を有する酵素、DNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有する酵素および RNaseH である分子コンピュータ。

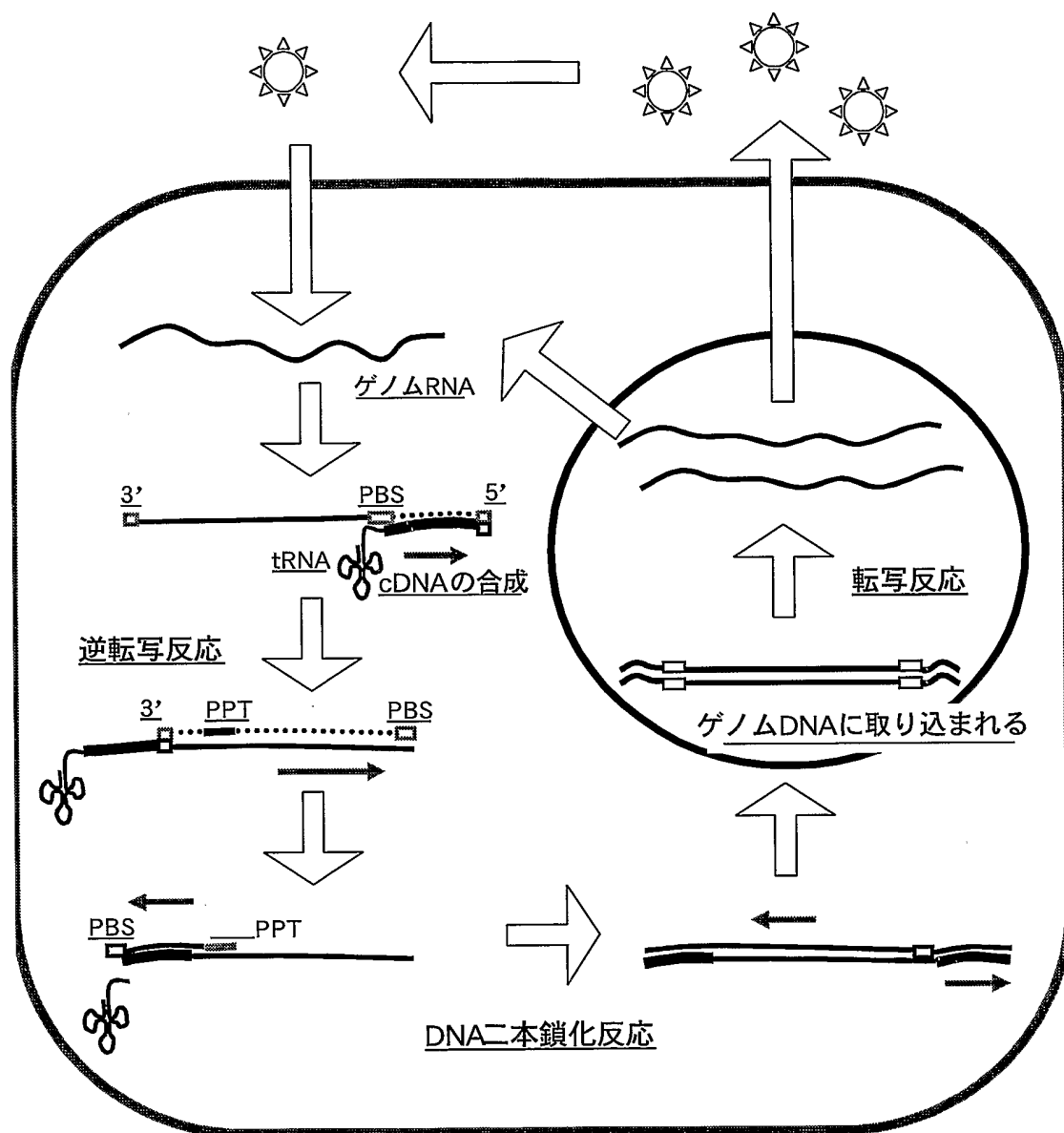


FIG. 1

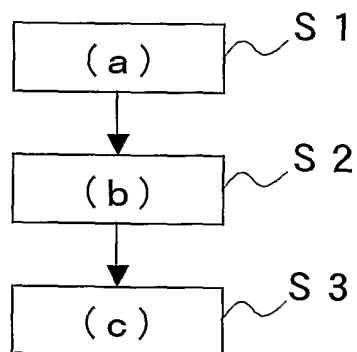


FIG. 2

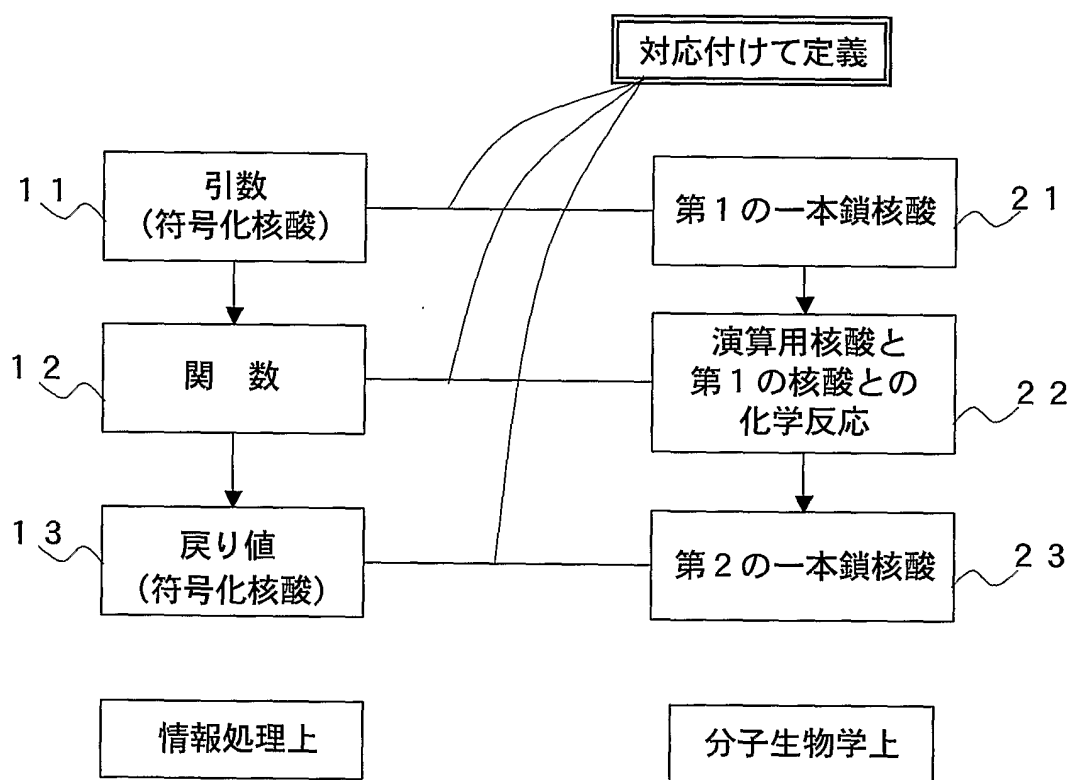


FIG. 3

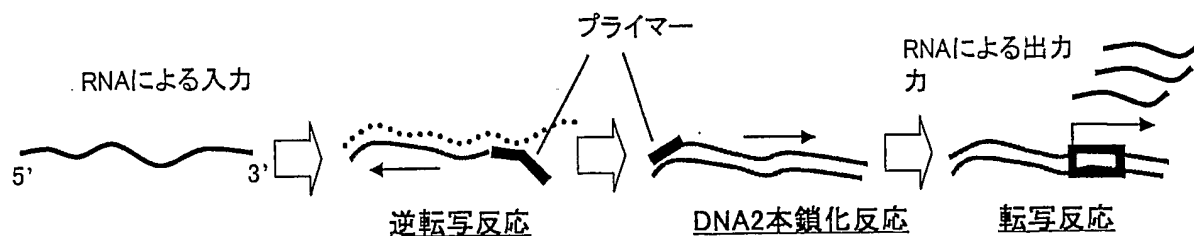


FIG. 4A

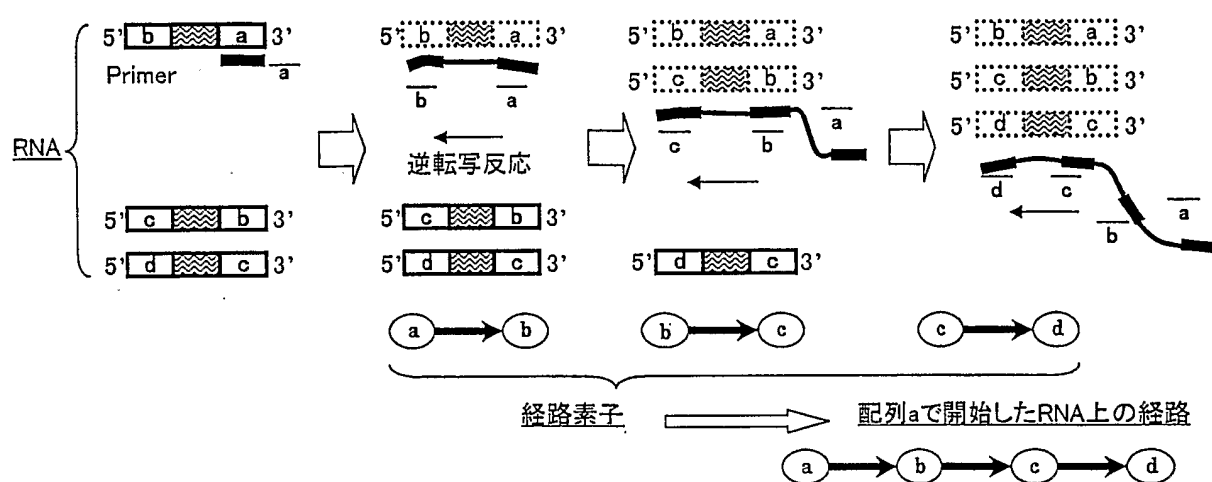


FIG. 4B

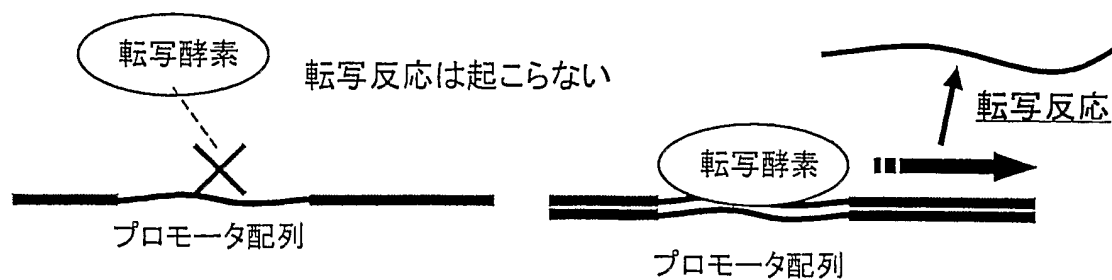


FIG. 4C

4/20

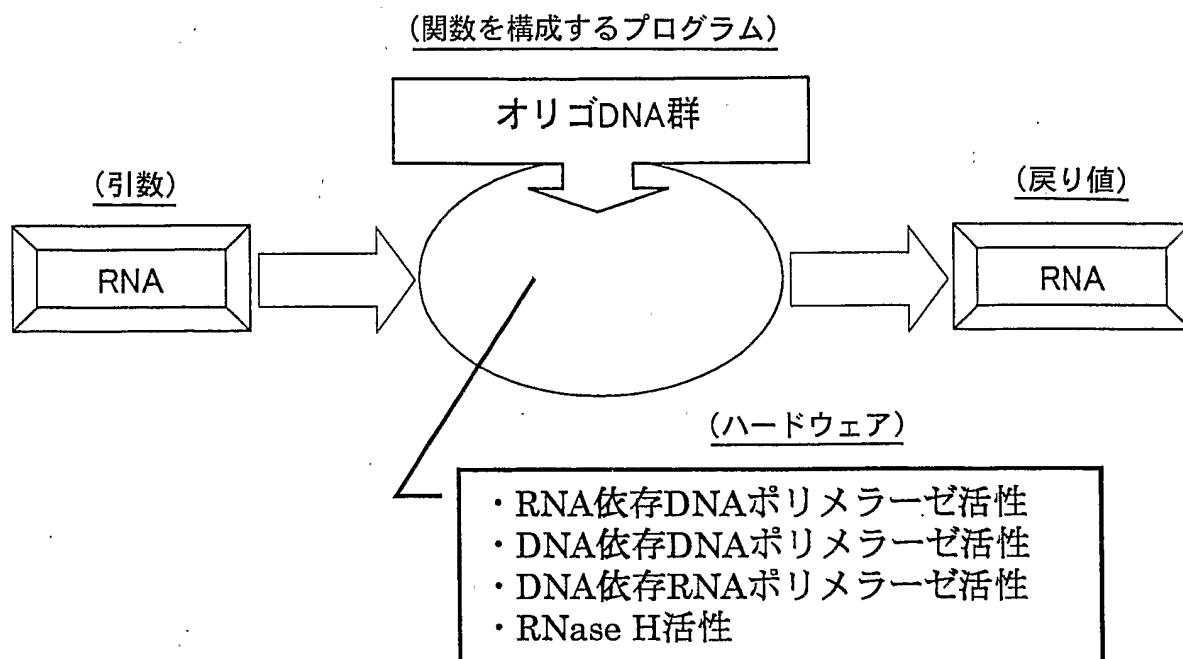


FIG. 5A

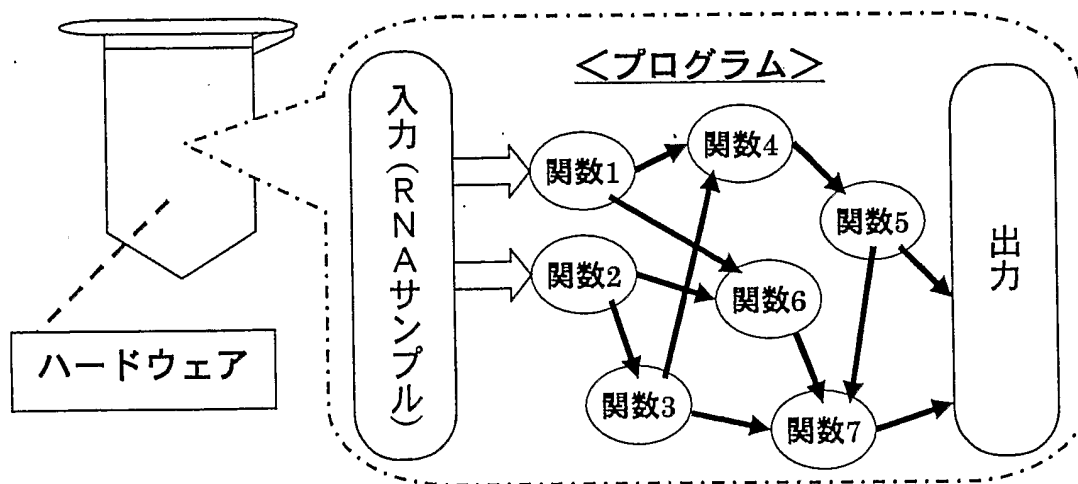


FIG. 5B

5/20

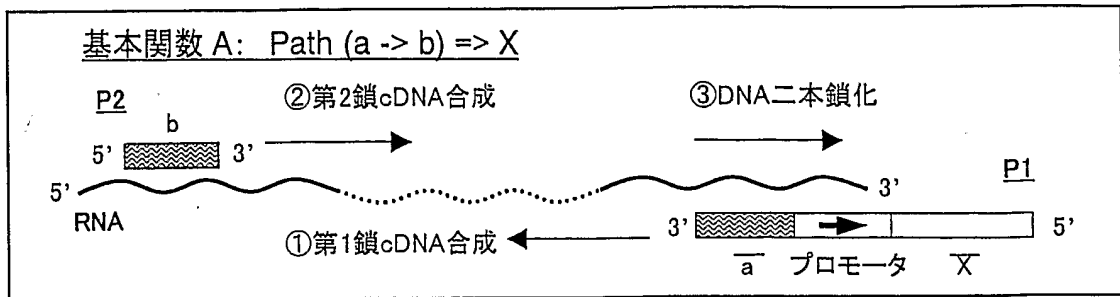


FIG. 6A

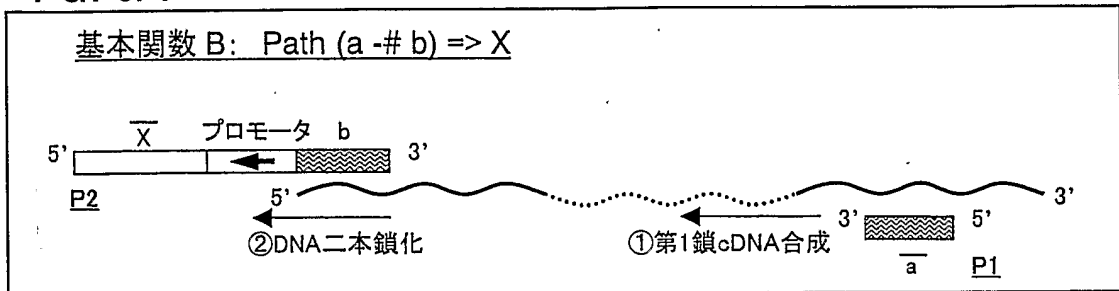


FIG. 6B

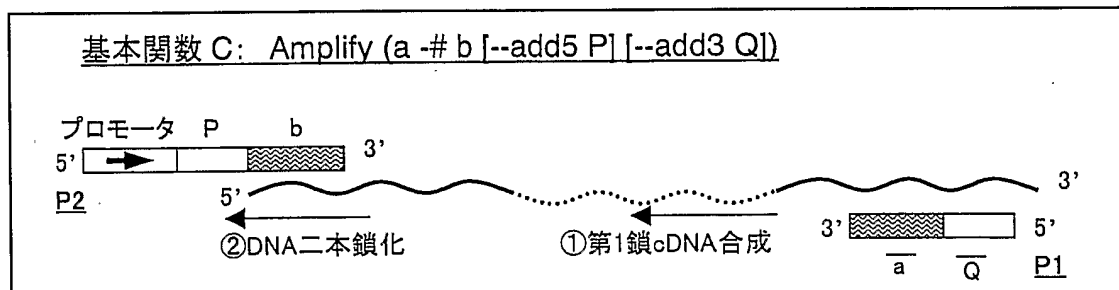


FIG. 6C

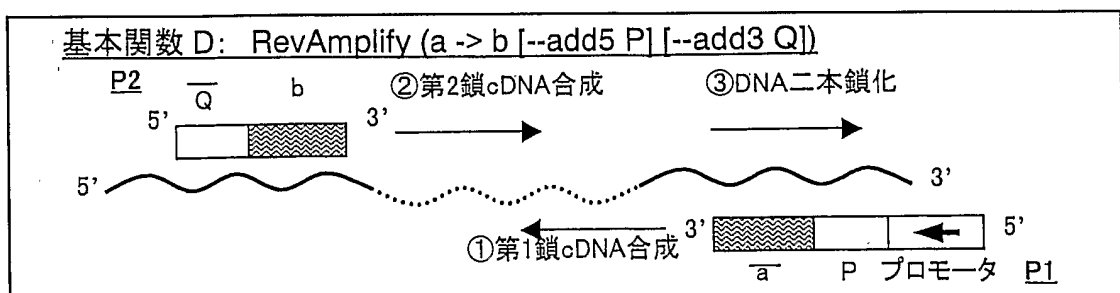


FIG. 6D

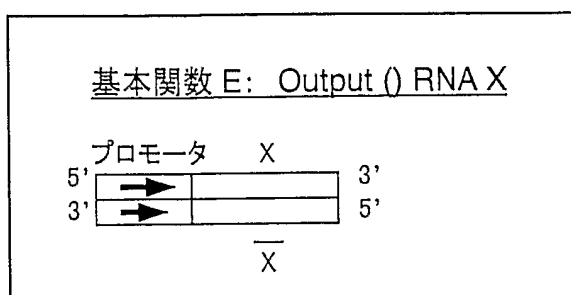


FIG. 6E

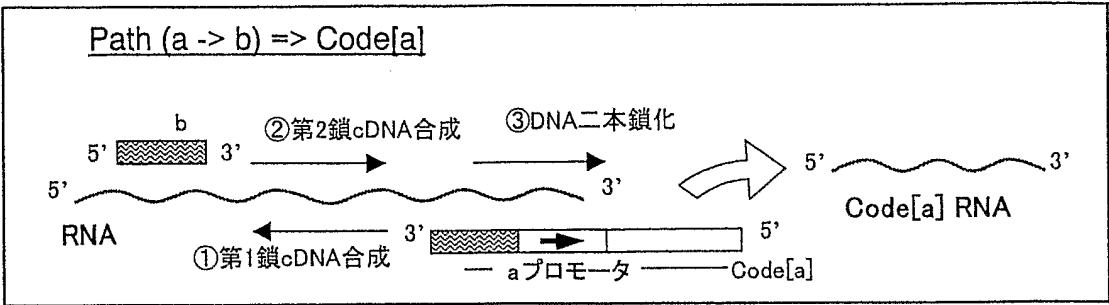


FIG. 7A

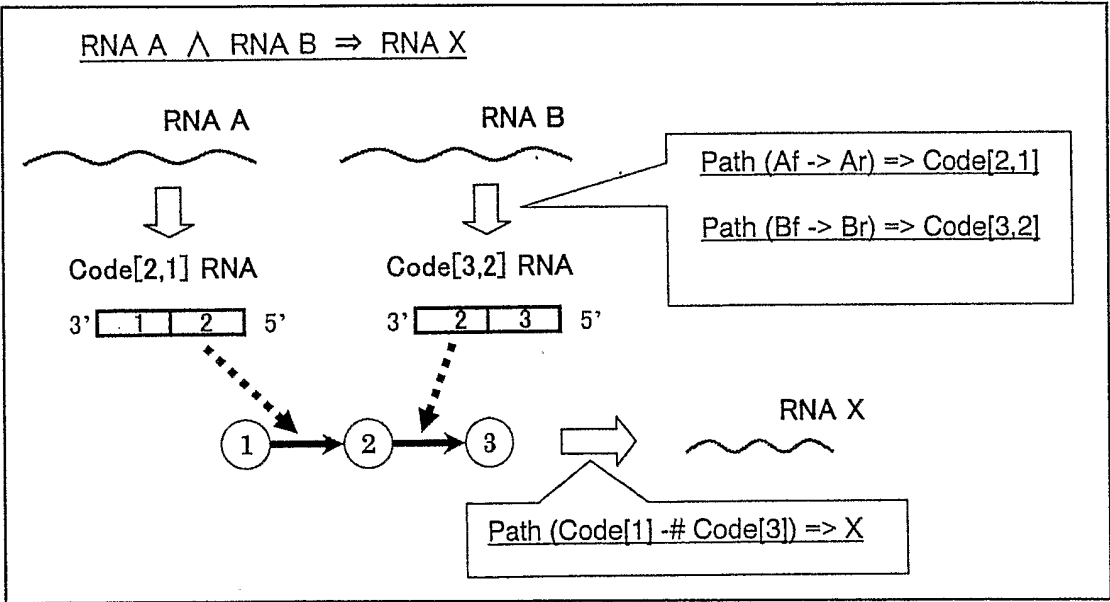


FIG. 7B

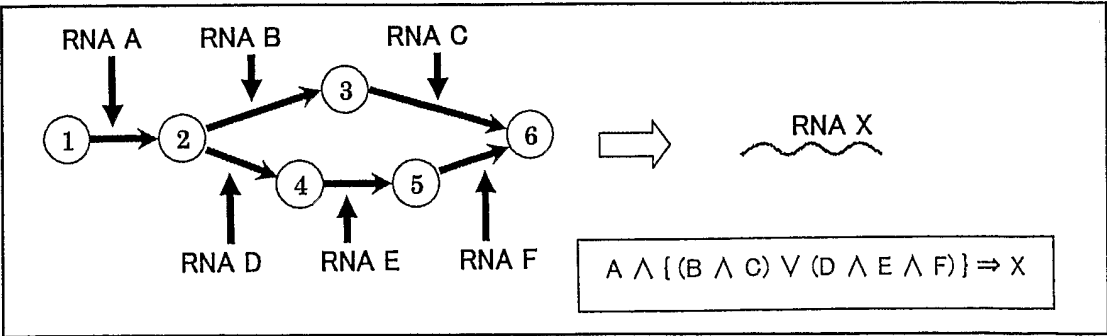


FIG. 7C

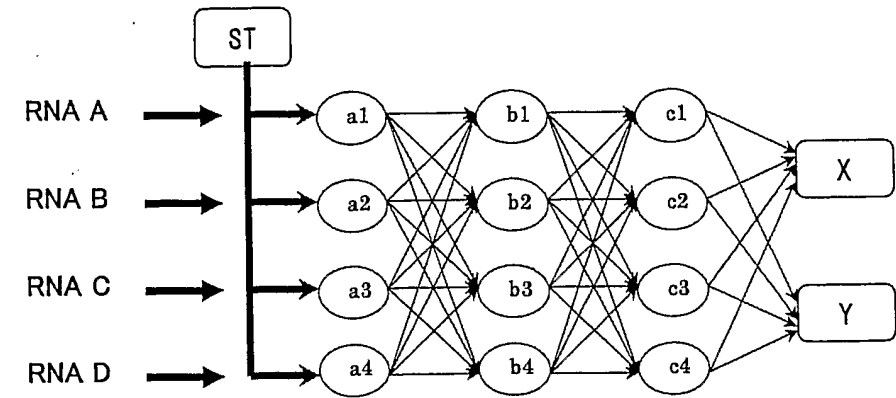


FIG. 8A

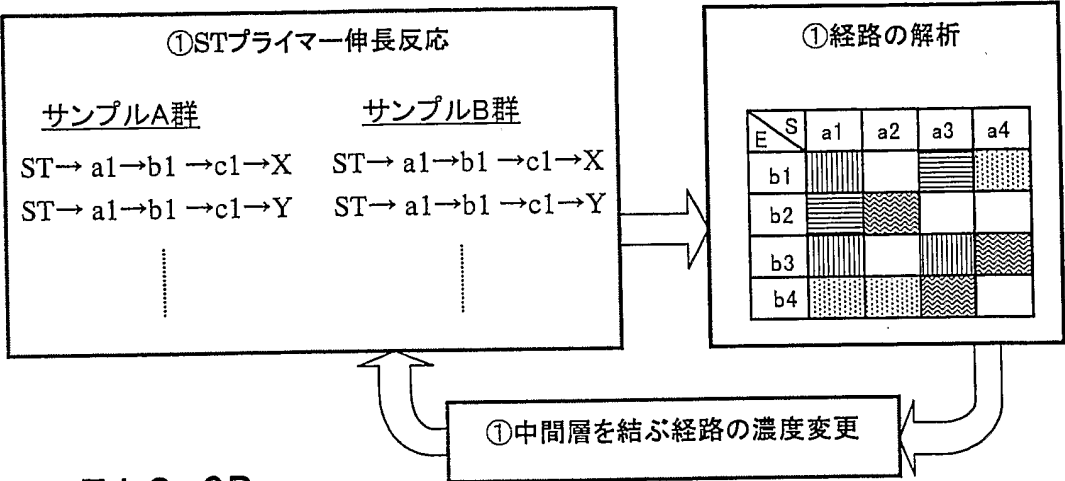


FIG. 8B

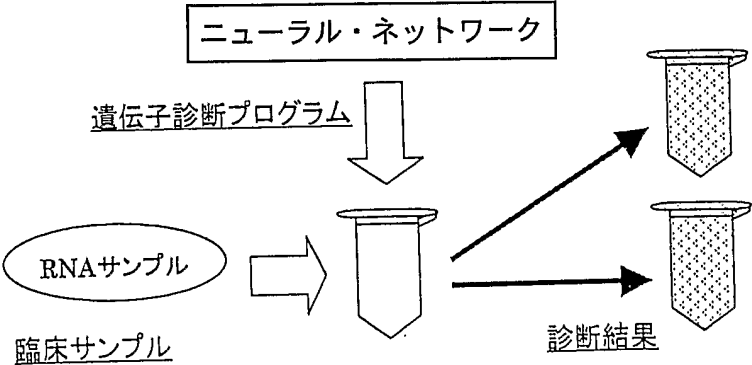


FIG. 8C

8/20

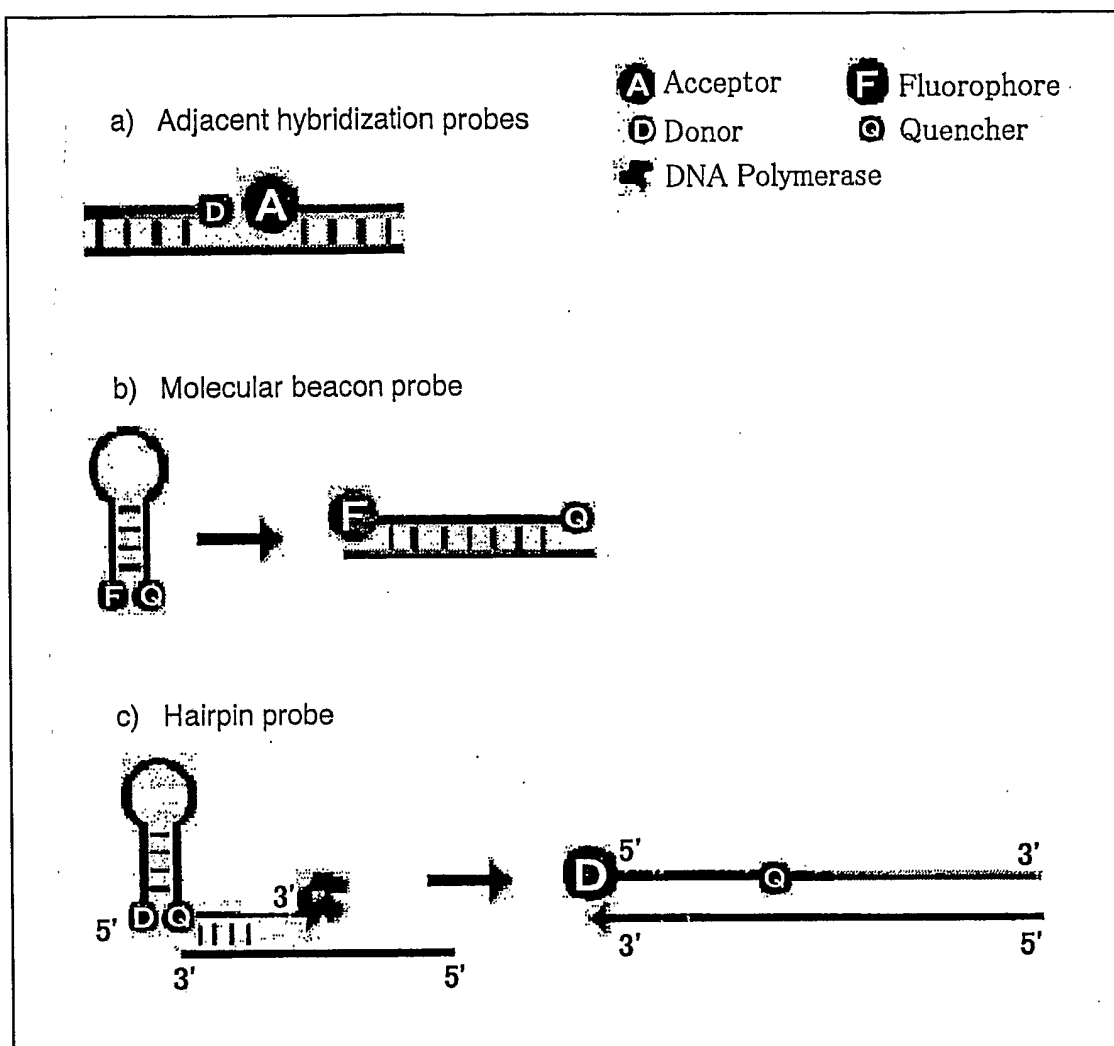


FIG. 9A

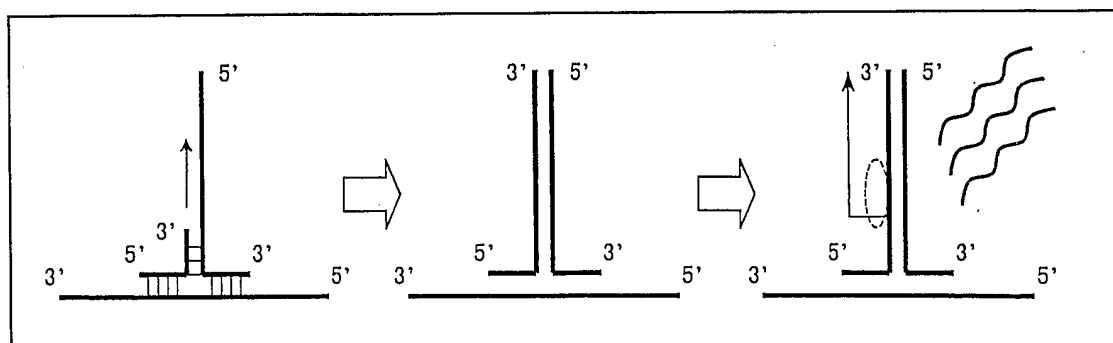


FIG. 9B

9/20

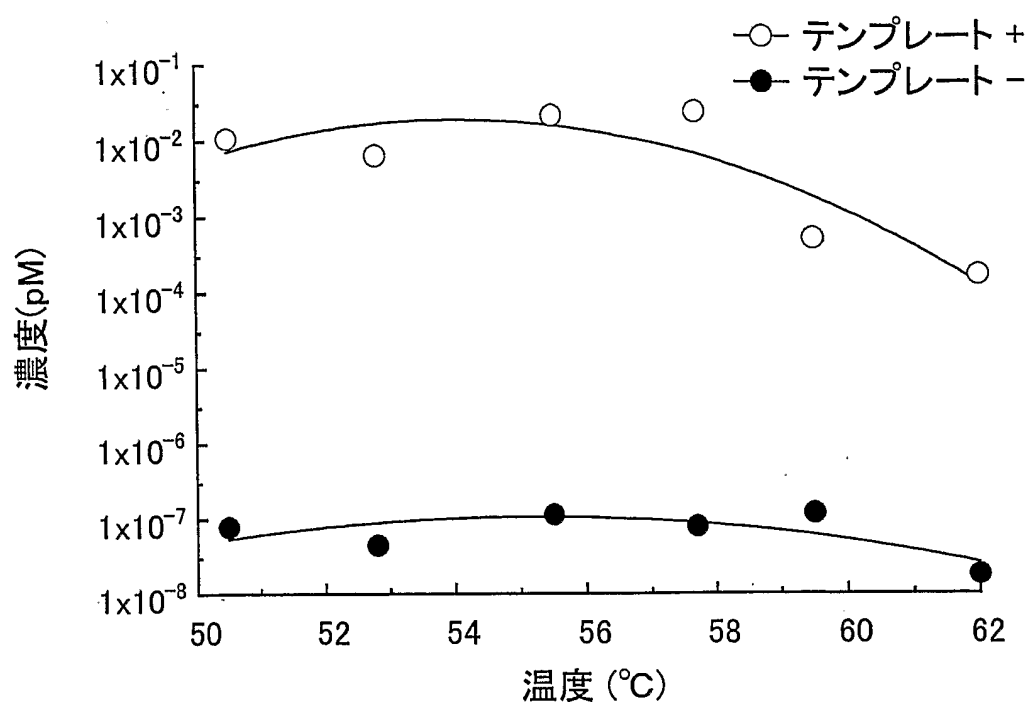


FIG. 10

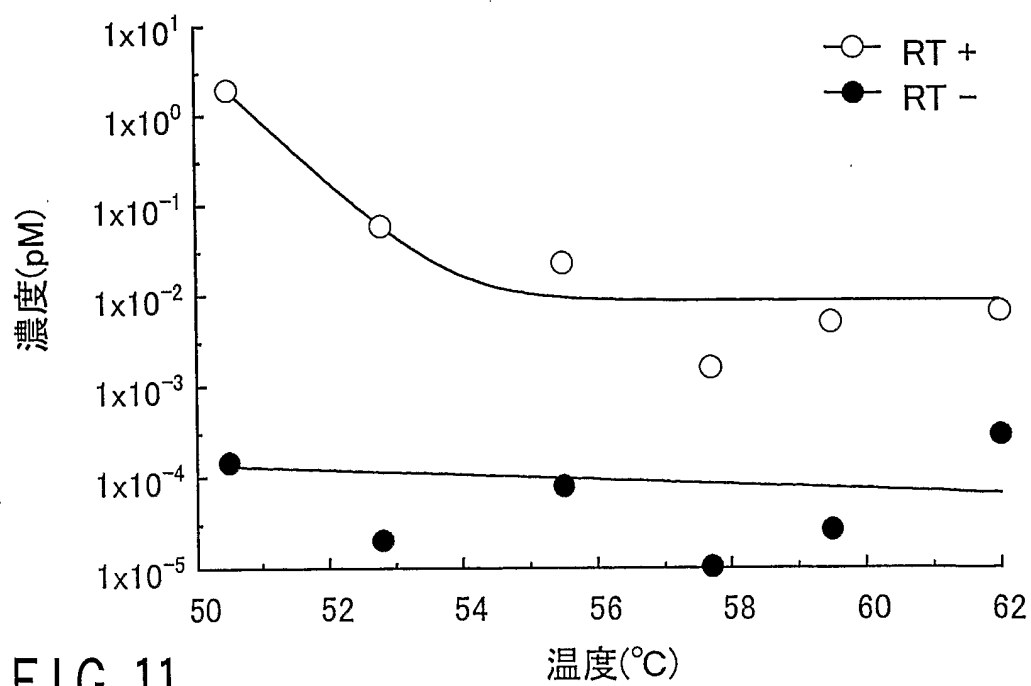


FIG. 11

10/20

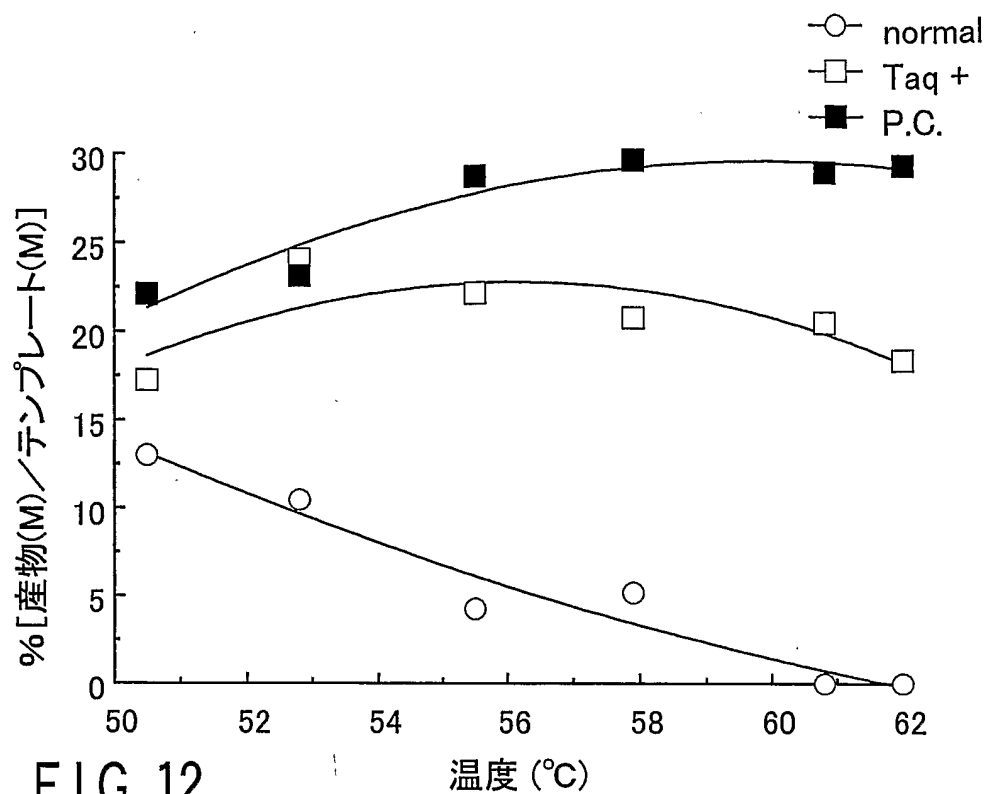


FIG. 12

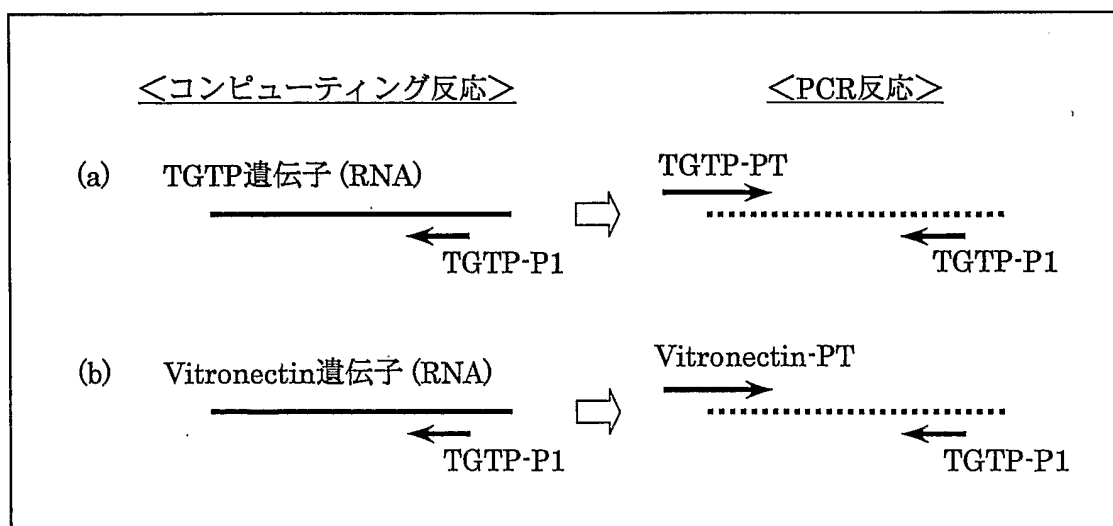
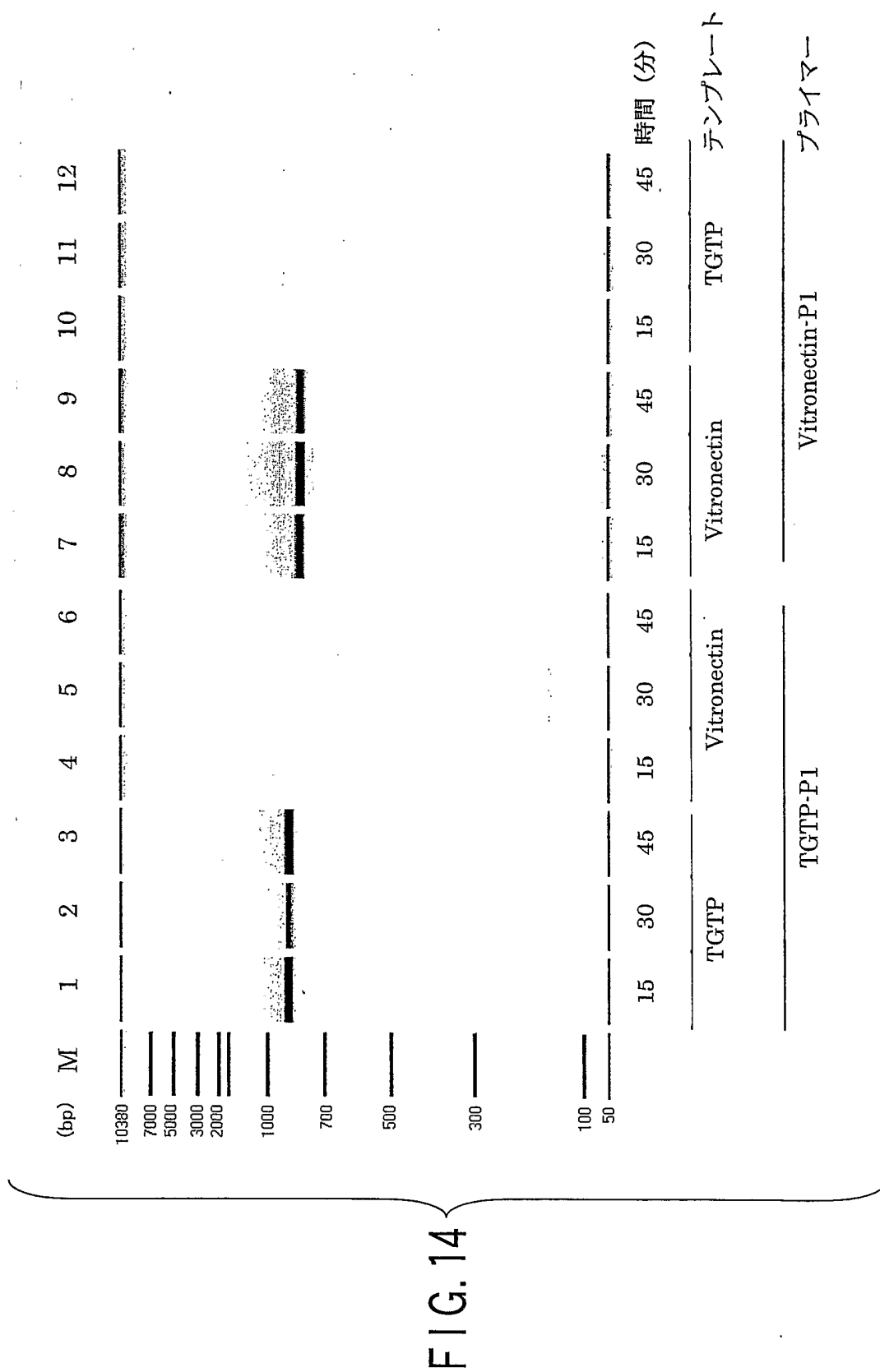


FIG. 13



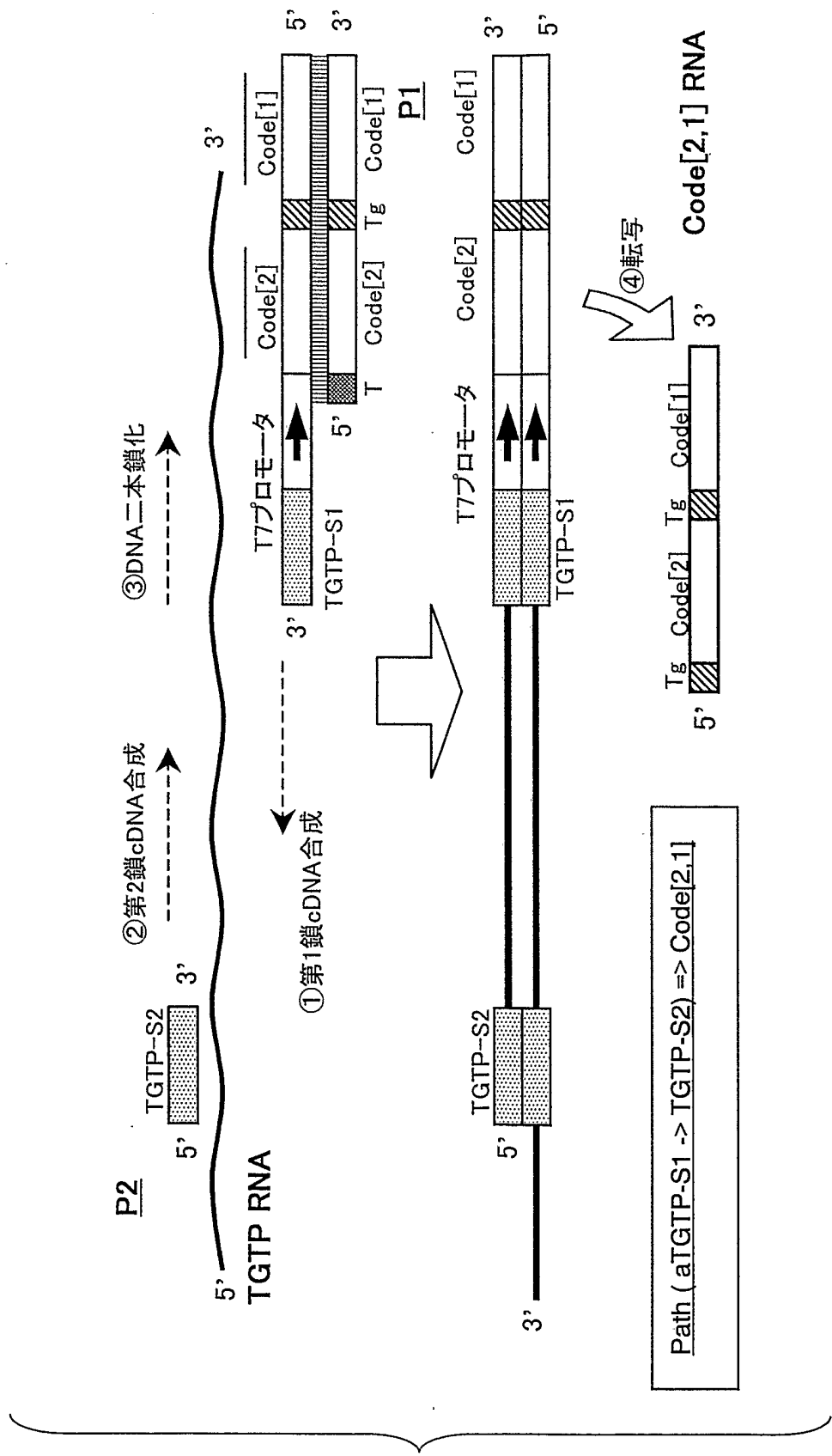


FIG. 15

13/20

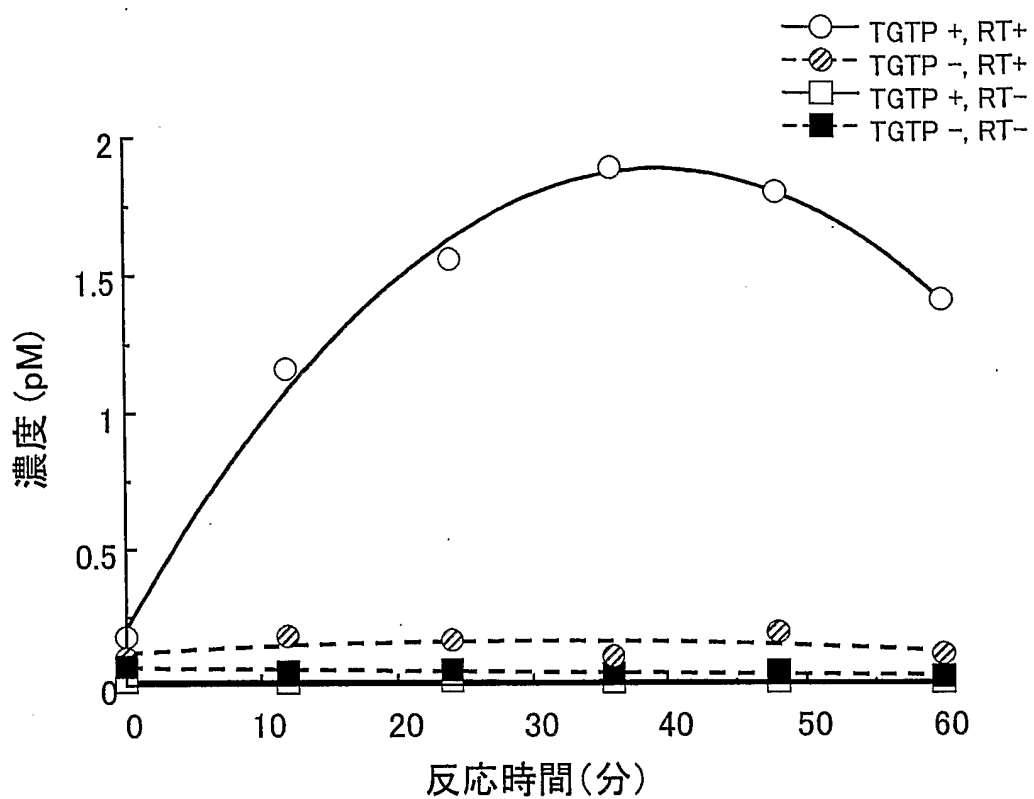


FIG. 16

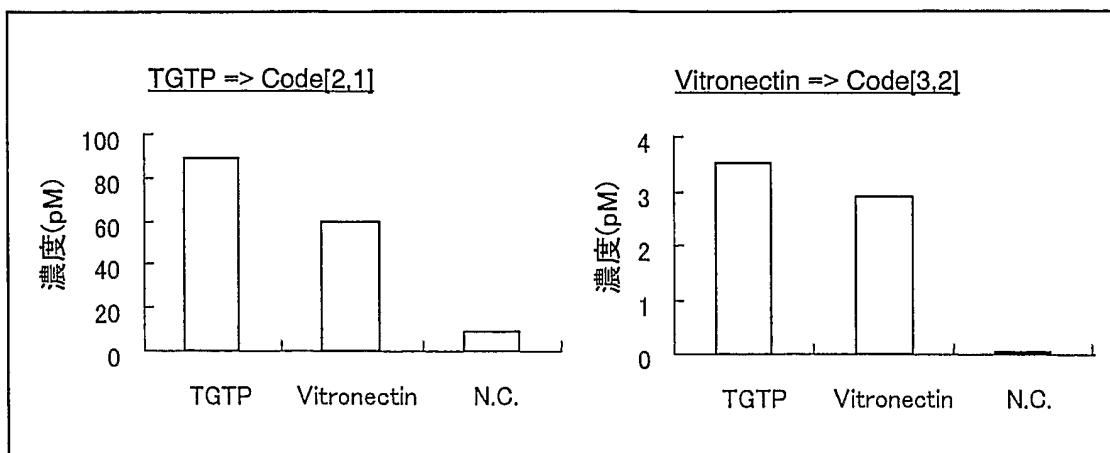


FIG. 17

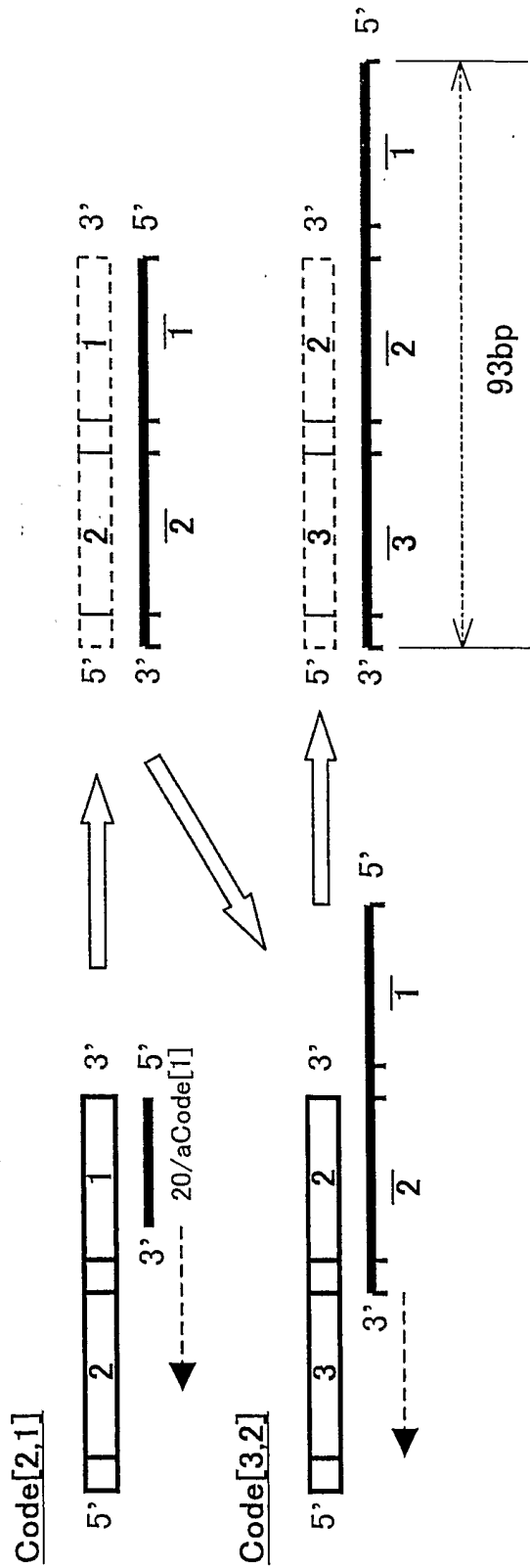


FIG. 18

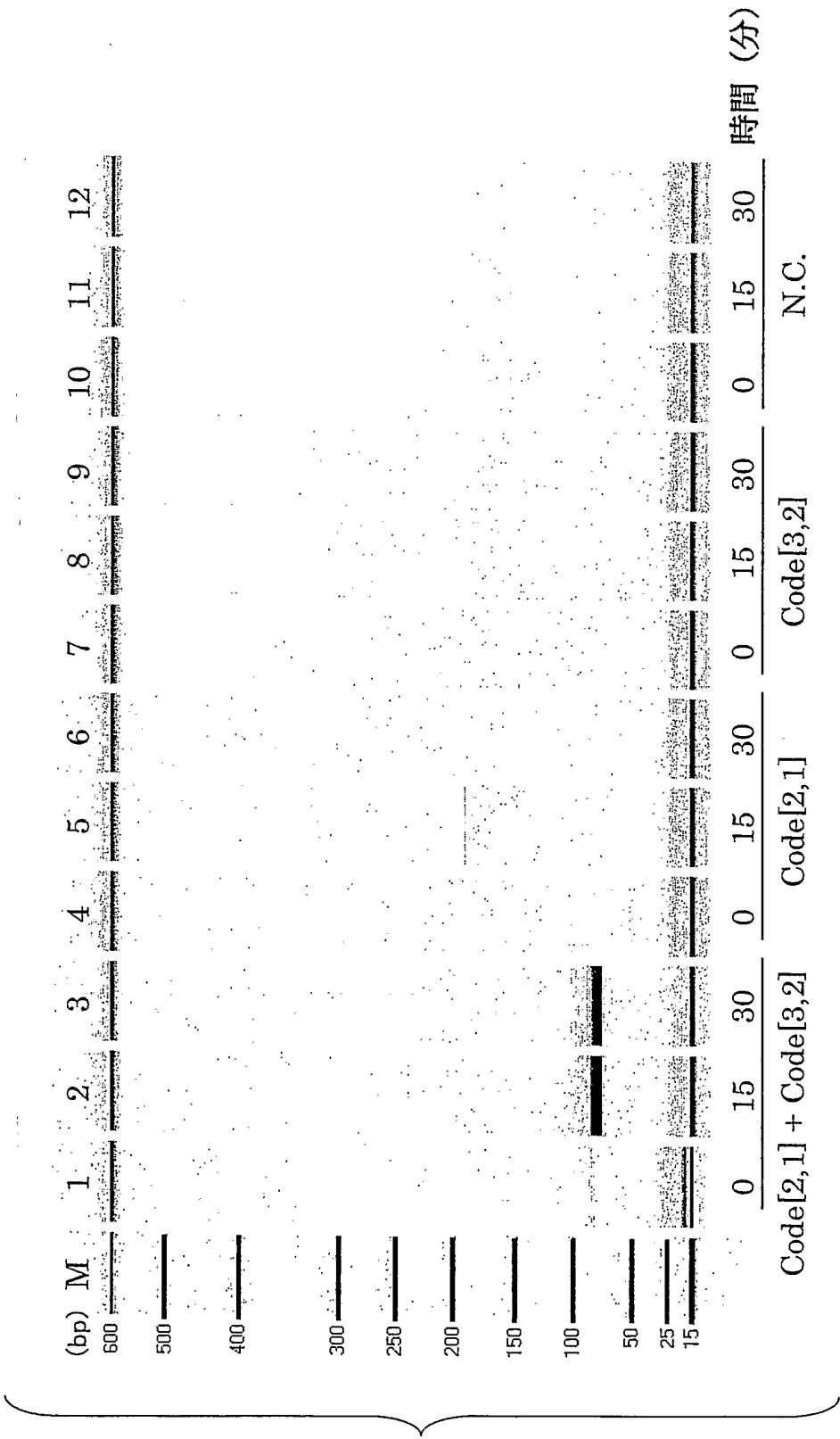


FIG. 19

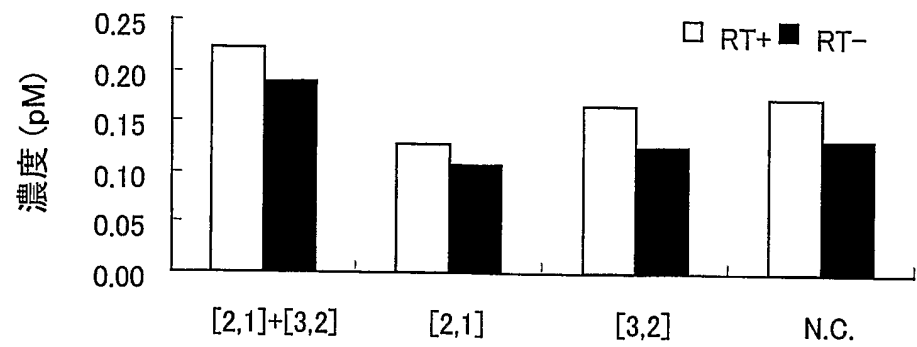


FIG. 21

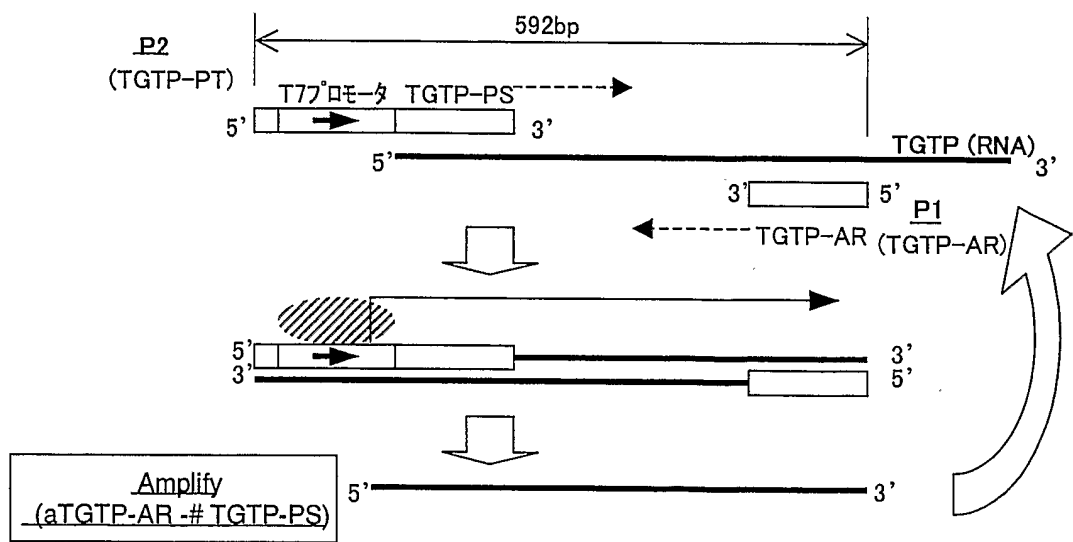


FIG. 22

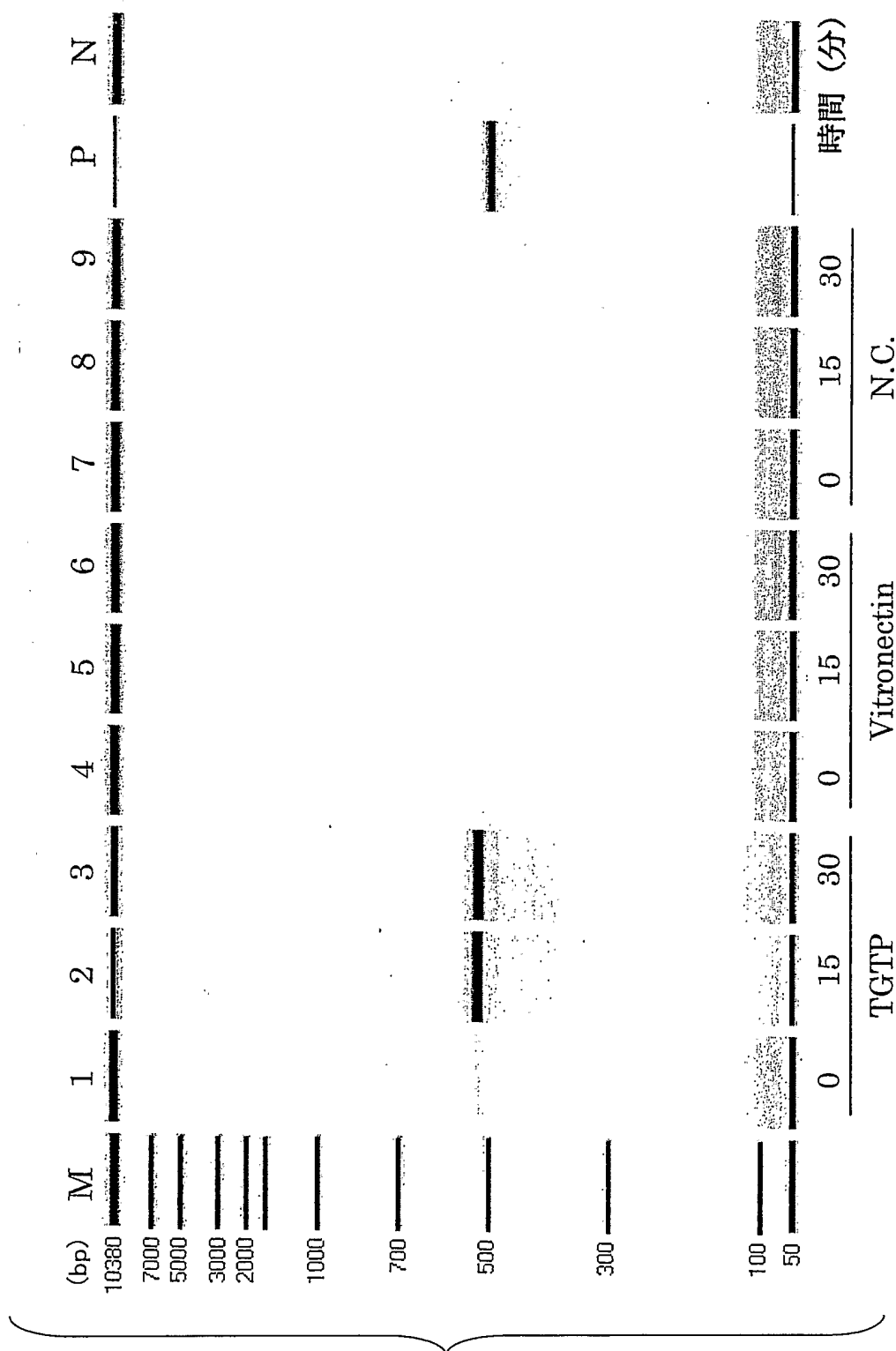


FIG. 23

19/20

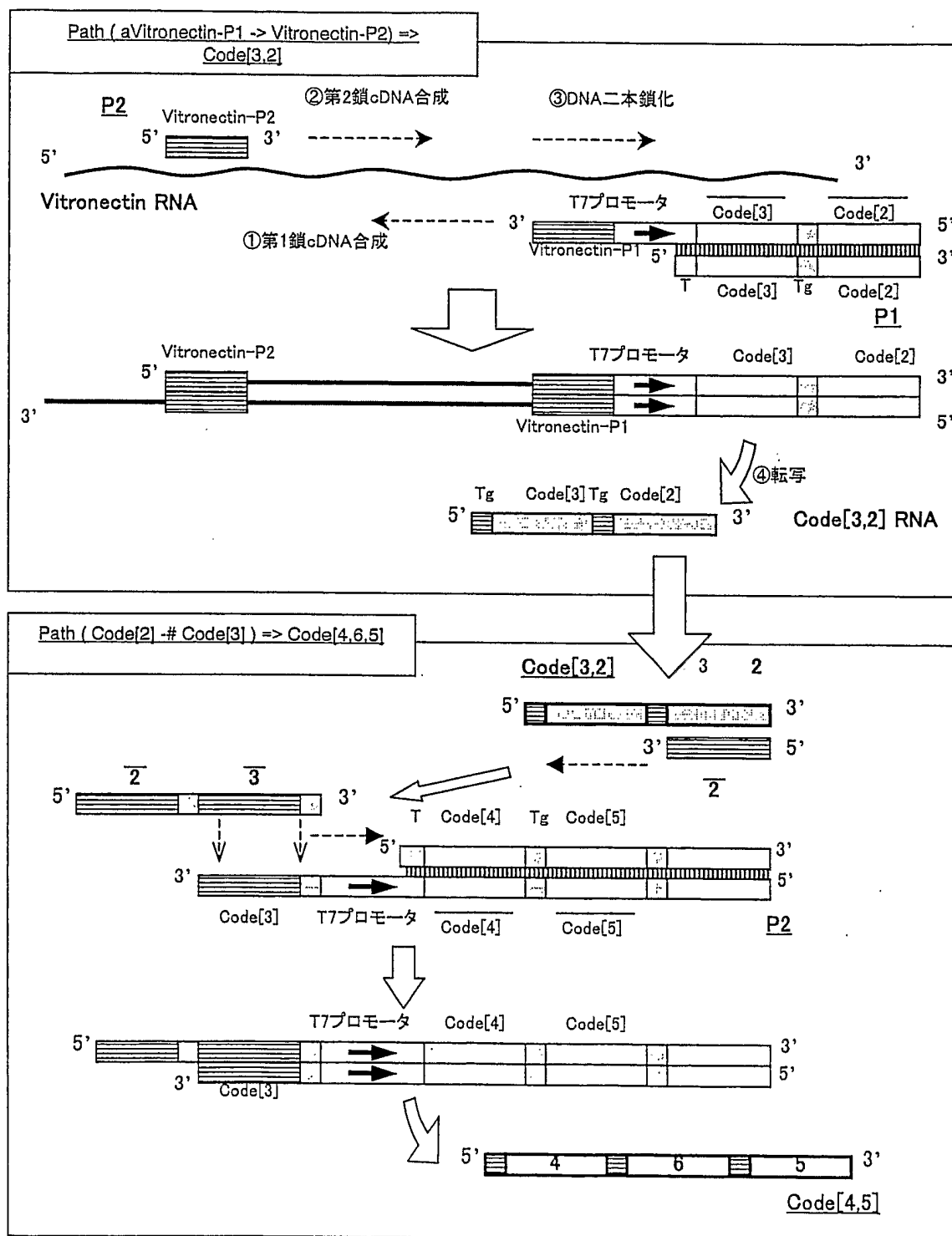


FIG. 24

20/20

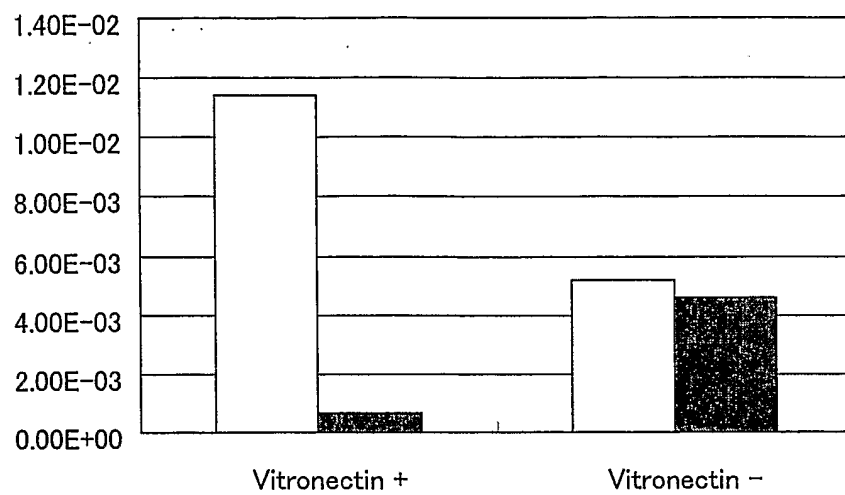


FIG. 25

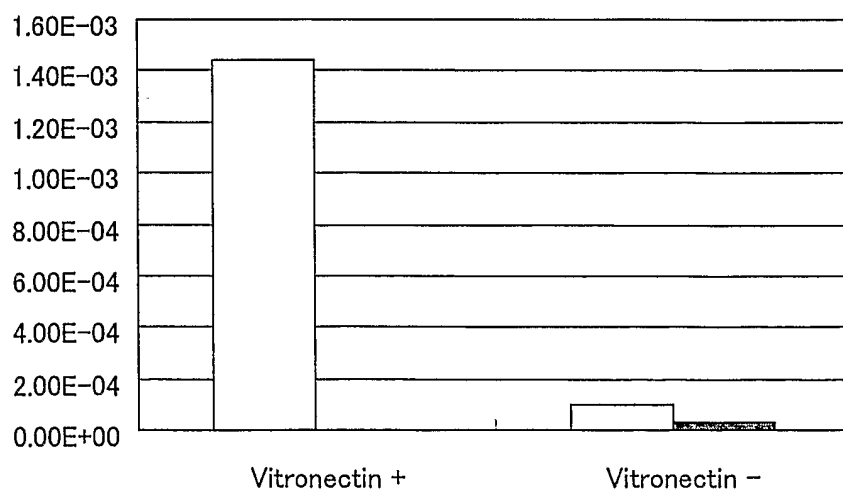


FIG. 26

1/9

SEQUENCE LISTING

<110> OLYMPUS CORPORATION

<120> The method of data processing using nucleic acid.

<130> 04S0132P

<150> JP2003-155988

<151> 2003-05-30

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: TGTP primer

<400> 1

cagatatata tgggtcccacc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: TGTP primer

<400> 2

gtagggagga ttcacagagt

20

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:code sequence

<400> 3

tgaagtcacc acaacacaca gtaca

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:code sequence

<400> 4

gacaaacacc ccgaatacaa acagc

25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:code sequence

<400> 5

agtatcgaag cgtgtgtctg aagat

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:code sequence

3/9

<400> 6

caaaagagtt aggatgggag ctgga

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:code sequence

<400> 7

tcgatatggg tggtagatga gaggt

25

<210> 8

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:TGTP primer

<400> 8

ctgaggttat cttggtctgg ggagatctcc ctatagttag tcgtattact gaggttatct 60

tggctctgggg agacagatat atatggtccc acc

93

<210> 9

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:TGTP primer

<400> 9

tgtactgtgt gttgtggtga cttcatctcc cgctgtttgt attcgggggtg tttgtctctc 60

4/9

cctatagtga gtcgtattac agatatatat ggtcccacc

99

<210> 10

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Vitronectin
primer

<400> 10

gctgtttgta ttcgggggtgt ttgtctctcc catcttcaga cacacgcttc gatacttctc 60
cctatagtga gtcgtattat ttgtctccag agaagaaat 99

<210> 11

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:TGTP primer

<400> 11

atagggagag acaaacaccc cgaatacaaa cagcgggaga tgaagtcacc acaacacaca 60
gtaca 65

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:TGTP primer

<400> 12

5/9

acttactatc gcatggetta

20

<210> 13

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Vitronectin

primer

<400> 13

ataggagagaa gtatcgaagc gtgtgtctga agatgggaga gacaaacacc ccgaatacaa 60

acagc

65

<210> 14

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:TGTP primer

<400> 14

gatgcataat acgactcact ataggagag gggatgaatt tctactttg

49

<210> 15

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Vitronectin

primer

<400> 15

6/9

gatgcataat acgactcact atagggagag taccctaaac ttatccaag 49

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:code sequence

<400> 16

tgtactgtgt gttgtggtga 20

<210> 17

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:code sequence

<400> 17

acctctcatg taccacccat atcgatctcc ctccagctcc catcctaact cttttgtctc 60
cctatagtga gtcgtattag ggagaagtat cgaagcgtgt gtctgaagat 110

<210> 18

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:code sequence

<400> 18

atagggagac aaaagagtta ggatgggagc tggagggaga tcgatatggg tggtagatga 60
gaggt 65

7/9

<210> 19

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:clump sequence

<400> 19

gatgca

6

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:T7 promoter
sequence

<400> 20

taatacgact cactataggg aga

23

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:TGTP primer

<400> 21

caggatttga acatgtctgt ggat

24

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: TGTP primer

<400> 22

gcttgtcttc taaggactca tcattg

26

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: TGTP primer

<400> 23

ggggatgaat ttctactttg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: TGTP primer

<400> 24

agagtgaaca ctgattggaa

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

9/9

<223> Description of Artificial Sequence:Vitronectin

primer

<400> 25

tttgtctcca gagaagaaat

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Vitronectin

primer

<400> 26

gctaggaacc tacaacaact

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Vitronectin

primer

<400> 27

gtaccccaaa cttatccaag

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G06F19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G06F19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	FAULHAMMER, D. "Molecular computation: RNA solutions to chess problems", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 15 February, 2000 (15.02.00), Vol.97, No.4, pages 1385 to 1389	1-8, 13-20 9-20
A	HUG, H. "Implementation of random walk method for solving 3-SAT on Circular DNA molecules", DNA Computing, 8th International Workshop on DNA Based Computers, DNA8, Sapporo, Japan, June 10-13, 2002, Revised Papers", Springer, April, 2003, pages 133 to 142	1-20
A	JP 6-502767 A (Shisuka Diagnostics Inc.), 31 March, 1994 (31.03.94), Full text; Figs. 1 to 2B & WO 92/08800 A1	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 April, 2004 (22.04.04)

Date of mailing of the international search report

11 May, 2004 (11.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000952

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-517458 A (Kurondiaku Chippu Technologies GmbH.), 09 October, 2001 (09.10.01), Full text; Figs. 1 to 5 & WO 99/15698 A2	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G 06 F 19/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G 06 F 19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

J I C S T ファイル (J O I S)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	FAULHAMMER, D. "Molecular computation: RNA solutions to chess problems", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, February 15, 2000, Vol. 97, No. 4, p. 1385-1389	1-8, 13-20
A		9-12
A	HUG, H. "Implementation of random walk method for solving 3-SAT on Circular DNA molecules", "DNA Computing, 8th International Workshop on DNA Based Computers, DNA8, Sapporo, Japan, June 10-13, 2002, Revised Papers", Springer, April 2003, p. 133-142	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.04.2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

丹治 彰

5 L

3136

電話番号 03-3581-1101 内線 3560

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 6-502767 A (シスカ・ダイアグノスティックス・ インコーポレーテッド) 1994. 03. 31, 全文, 1-2B図 & WO 92/08800 A1	1-20
A	JP 2001-517458 A (クロンディアーク チップ テクノロジーズ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハ フツング) 2001. 10. 09, 全文, 1-5図 & WO 99/15698 A2	1-20