

DNA分子

デザイン

2016年度版



のすべて

国際学生コンテスト

～BIOMQD虎の巻～



分子ロボティクス研究会編

DNA 分子デザインのすべて BIOMOD 虎の巻

分子ロボティクス研究会編

eBook Series No. 2

情報計算化学生物学会 (CBI 学会) 出版

2016 年 4 月 15 日発行

ISBN 978-4-9903708-9-3

目次

第1章 BIOMOD に参加しよう

- | | | |
|----|----------------------|--------------|
| 1 | DNA 分子デザインの世界へようこそ！ | 村田 智(東北大学) |
| 2 | BIOMOD とは | 浜田省吾(コーネル大学) |
| 3 | BIOMOD の評価システム | 藤原 慶(慶應義塾大学) |
| 4 | BIOMOD Jamboree の一日 | 藤原 慶(慶應義塾大学) |
| 5 | 受賞プロジェクトから学ぶ必勝法 | 藤原 慶(慶應義塾大学) |
| 6 | BIOMOD カレンダー | 多田隈尚史(京都大学) |
| 7 | グループワークのテクニック | 野村慎一郎(東北大学) |
| 8 | Wiki 作成テクニック | 多田隈尚史(京都大学) |
| 9 | YouTube ビデオ作成テクニック | 浜田省吾(コーネル大学) |
| 10 | 英語プレゼンテクニック | 村田 智(東北大学) |
| 11 | BIOMOD で得たもの, 得られるもの | 藤原 慶(慶應義塾大学) |

第2章 プロジェクトを始める前に

- | | | |
|----|---------------|--------------|
| 12 | テーマを選ぼう！ | 村田 智(東北大学) |
| 13 | ブレインストーミングの方法 | 菅原 研(東北学院大学) |
| 14 | 設計するとはどういうことか | 村田 智(東北大学) |
| 15 | 情報を手に入れよう | 高島美弥(東北大学) |
| 16 | 論文ってなんだ！ | 野村慎一郎(東北大学) |

第3章 DNA 分子デザインでこんなことができる！

- | | | |
|----|-----------------------------|--------------|
| 17 | 概論 構造 DNA ナノテクノロジーとは | 浜田省吾(コーネル大学) |
| 18 | 2次元 DNA オリガミ | 葛谷明紀(関西大学) |
| 19 | 3次元 DNA オリガミ | 葛谷明紀(関西大学) |
| 20 | DNA タイル | 浜田省吾(コーネル大学) |
| 21 | DNA 修飾ナノ粒子(SNA) | 浜田省吾(コーネル大学) |
| 22 | DNA ハイドロゲル | 浜田省吾(コーネル大学) |
| 23 | 概論 DNA ナノマシン, ナノロボット | 村田 智(東北大学) |
| 24 | DNA ピンセット | 小宮 健(東京工業大学) |
| 25 | DNA ウォーカー | 小宮 健(東京工業大学) |
| 26 | DNA ナノマシン | 葛谷明紀(関西大学) |

27	自律的な DNA 反応系	瀧ノ上正浩(東京工業大学)
28	概論 DNA コンピューティングとは	萩谷昌己(東京大学)
29	DNA 論理ゲート	萩谷昌己(東京大学)
30	DNAzyme 論理ゲート	川又生吹(東北大学)
31	エントロピー駆動ゲート	川又生吹(東北大学)
32	シーソーゲート	中荃 隆(九州工業大学)
33	DNAToolbox	Nathanael Aubert-Kato(御茶ノ水女子大学) 訳 川又生吹(東北大学)
34	DNA 状態機械	小宮 健(東京工業大学)
35	巡回セールスマン問題	萩谷昌己(東京大学)

第4章 基礎知識(お勉強編)

36	概論 どんな分野の勉強が必要か	小宮 健(東京工業大学)
37	熱力学の基礎知識	高島芙弥(東北大学)
38	自由エネルギーと化学平衡	高島芙弥(東北大学)
39	反応速度論	高島芙弥(東北大学)
40	DNA の分子構造	森田雅宗, 瀧ノ上正浩(東京工業大学)
41	DNA ハイブリダイゼーションの熱力学	瀧ノ上正浩(東京工業大学)
42	鎖置換反応	川又生吹(東北大学)
43	DNA の 2 次構造	田中文昭(産業技術総合研究所)
44	DNA 合成法	葛谷明紀(関西大学)

第5章 DNA をパワーアップする飛び道具たち

45	いろいろな酵素	多田隈尚史(京都大学)
46	ポリメラーゼ反応	浜田省吾(コーネル大学)
47	いろいろな制限酵素	多田隈尚史(京都大学)
48	いろいろな人工塩基	葛谷明紀(関西大学)
49	非ワトソククリック構造	葛谷明紀(関西大学)
50	タンパク質モーター	佐々木廉, 角五 彰(北海道大学)
51	FRET と分子ビーコン	多田隈尚史(京都大学)
52	人工細胞とリポソーム(とその周辺)	野村慎一郎(東北大学)

第6章 ソフトウェアテクニック

53	概論 まず覚えないソフトウェア	中荃 隆(九州工業大学)
54	文書・表・グラフ作成	中荃 隆(九州工業大学)

55	プレゼンスライド作成	村田 智(東北大学)
56	画像作成	中荃 隆(九州工業大学)
57	3DCG アニメーションの制作	津澤 卓, 川又生吹(東北大学)
58	画像処理	野村慎一郎(東北大学)
59	動画編集	川又生吹(東北大学)
60	数値計算ライブラリ	中荃 隆(九州工業大学)
61	DNA 分子設計のためのソフトウェア	川又生吹(東北大学)
62	DNA2次構造予測	田中文昭(産業技術総合研究所)
63	配列設計	川又生吹(東北大学)
64	DNA オリガミの設計	多田隈尚史(京都大学)
65	DNA オリガミのシミュレーション	川又生吹(東北大学)
66	DNA 分子モデル作成	川又生吹(東北大学)
67	DNA 論理ゲートシミュレーション	川又生吹(東北大学)

第7章 実験テクニック

68	概論 実験するとはどういうことか	野村慎一郎(東北大学)
69	実験の組み立て方	森田雅宗, 瀧ノ上正浩(東京工業大学)
70	安全について	宮元展義, 中山美紀(福岡工業大学)
71	プロトコルの読み方	宮元展義, 中山美紀(福岡工業大学)
72	DNA のオーダーの仕方	葛谷明紀(関西大学)
73	その他の試薬の入手	佐々木廉, 角五 彰(北海道大学)
74	ピペット操作	鈴木隆平, 角五 彰(北海道大学)
75	各種用液・バッファー作成	鈴木隆平, 角五 彰(北海道大学)
76	アニーリング	浜田省吾(コーネル大学)
77	DNA 濃度/純度測定	小宮 健(東京工業大学)
78	いろいろな精製法	葛谷明紀(関西大学)
79	電気泳動法	森田雅宗, 瀧ノ上正浩(東京工業大学)
80	電気泳動の評価	川又生吹(東北大学)
81	蛍光分光光度計	森田雅宗, 瀧ノ上正浩(東京工業大学)
82	UV 分光光度計	川又生吹(東北大学)
83	光学顕微鏡	鈴木隆平, 角五 彰(北海道大学)
84	原子間力顕微鏡	葛谷明紀(関西大学)
85	電子顕微鏡	多田隈尚史(京都大学)
86	微粒子測定	宮元展義, 中山美紀(福岡工業大学)
87	フローサイトメータ/セルソータ	野村慎一郎(東北大学)
88	表面プラズモン共鳴測定	野村慎一郎(東北大学)

- | | | |
|----|------------------------|------------------------------------|
| 89 | リポソーム作成法 | 森田雅宗, 瀧ノ上正浩(東京工業大学)
野村慎一郎(東北大学) |
| 90 | マイクロ/ナノビーズ技術 | 早川雅之, 森田雅宗,
瀧ノ上正浩(東京工業大学) |
| 91 | いろいろな分析手法(MS, NMR, CD) | 宮元展義, 中山美紀(福岡工業大学) |

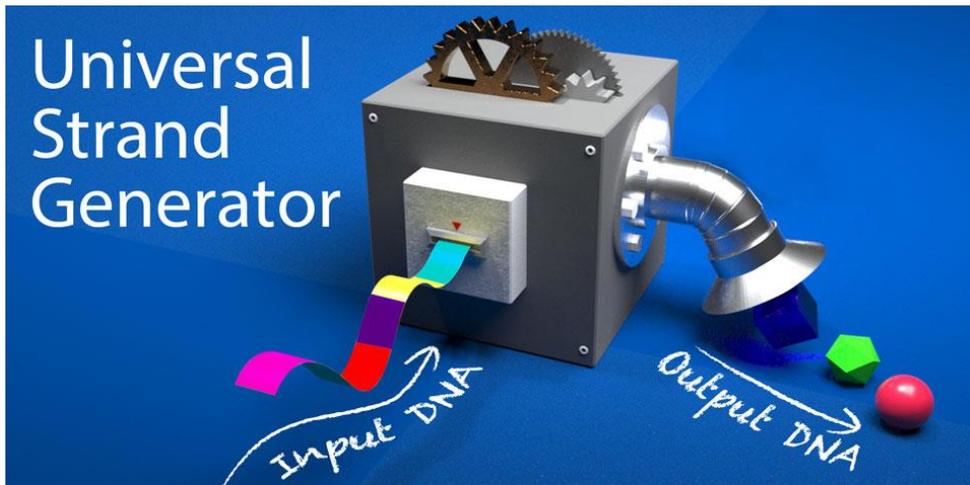
第8章 実験してみよう(実践編)

- | | | |
|----|-------------------|--------------|
| 92 | DNA タイルの作製とAFM 観察 | 浜田省吾(コーネル大学) |
| 93 | DNA オリガミの作製と観察 | 多田隈尚史(京都大学) |
| 94 | DNA ゲートの作製と観察 | 川又生吹(東北大学) |
| 95 | DNA ピンセットの作製と観察 | 川又生吹(東北大学) |

コラム

1	分子ロボ研究会と分子ロボプロジェクト	村田 智
3	MOLBOT 賞	藤原 慶
4	1 日が 25 時間になる日	藤原 慶
4	ボストンの楽しみ方	藤原 慶
5	審査員を信用しないこと	藤原 慶
12	著作権について	村田 智
14	MIRACLE	村田 智
18	DNA オリガミでつくったパラパラマンガ	葛谷明紀
20	DNA ブリック	浜田省吾
20	「閉じた」DNA ナノ構造	浜田省吾
32	複雑な計算回路	中荃 隆
40	RNA	森田雅宗, 瀧ノ上正浩
43	タンパク質の構造	田中文昭
44	水気厳禁!	葛谷明紀
46	PCR 法	浜田省吾
47	ギブソン・アセンブリー	多田隈尚史
47	遺伝子全合成	多田隈尚史
48	便利なビオチン-ストレプトアビジン相互作用	葛谷明紀
54	TeX とは	中荃 隆
60	統計処理ソフト R	中荃 隆
62	BLAST	田中文昭
78	DNA オリガミの精製	葛谷明紀
85	生きた生物を電子顕微鏡で観察する	多田隈尚史
87	イメージングサイトメータ	野村慎一郎
90	Biomolecular Rocket	早川雅之, 瀧ノ上正浩
90	マイクロゲルビーズ作製法	早川雅之, 瀧ノ上正浩

Universal Strand Generator



The Tales of Order 東北大学 2014年

第1章

BIOMODに参加しよう

1. DNA 分子デザインの世界へようこそ！

DNA を代表とする生体高分子の配列をデザインして、複雑なナノデバイス、ナノ構造を創り出すことが可能になってきた。これは分子レベルからのモノづくり革命であり、近い将来、20 世紀のシリコン半導体技術に匹敵する巨大な技術体系に発展していくだろう。無限の可能性を秘めた分子デザインの世界へようこそ！

■ 人工物と生物の根本的な違い！？

私たちの身の回りには、金属でできたもの、プラスチックでできたもの、木や土でできたものなど様々なモノがある。これらはいずれも材料の塊を削ったり、型に流し込んだりしてその形が作られている。建築物、機械、日用品など、基本的にはどんなモノもこの方法で作られている。この方法では材料の塊と、それを加工するための道具や工場が必要だ。

一方、生物のからだはどうか？生物はほかの生物を食べ、食べた物質を分解して自分の体につくり変える。道具も工場もつかわない。信じられないくらい複雑な化学反応でもって、物質を形と構造を持ったシステムに変えていくのだ。我々のからだを構成する細胞は、きわめて精密に合成された無数の生体高分子からできている。それは、これまで人間が創り出した最高に精密な半導体回路よりもはるかに精密で、はるかに大規模だ。

■ 生物のしくみ ～セントラルドグマ

現在、生物の中で起こっている化学反応はかなりよくわかっている。その大筋は、DNA→RNA→タンパク質という 3 種類の高分子の変換反応である（セントラルドグマ）。ここでは、高分子鎖の配列（塩基配列やアミノ酸配列）が本質的な意味を持つ。DNA は遺伝情報を保存する高分子であり、4 種類の塩基（A,C,T,G）がひも状に連なったものである。それが、RNA という別のひも状中間体に一旦写し取られ（転写）、さらにそれがアミノ酸の配列、すなわちタンパク質に変換（翻訳）される。こうして作られるタンパク質のかたちや性質は、大元の DNA の塩基配列によってきまる。生物のいろいろな機能は主にタンパク質によって担われている。言い換えれば、生物の機能はすべて DNA の塩基配列に書かれていると

いうことだ。

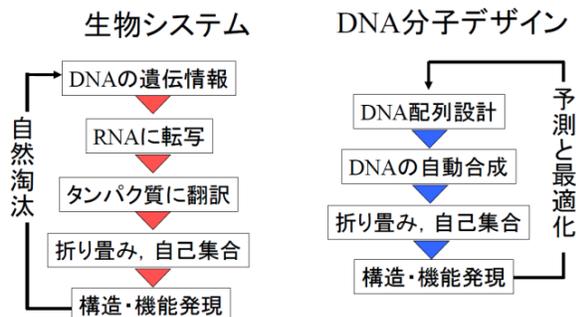
■ 生物の原理によるモノづくりへ

1950 年代のワトソンとクリックによる DNA の発見（☞ 41）からはじまった分子生物学は、ライフサイエンスという科学の一大分野に発展している。生物というシステムを構成する部品のひとつひとつのしくみが徹底的に調べられ、部品と部品間の関係もどんどんわかってきた。R. Feynman は “What I cannot create, I do not understand” と言ったそうだが（その対偶をとれば、原理がわかれば、そういうモノが作れるということ）、こうした分子生物学の発展の中で、生物の原理をつかっ、て、人工的なモノをつくろうという発想が生まれてきた。その始まりが N. Seeman の DNA でナノ構造を作る研究(1984 年)である。彼は DNA を遺伝情報の担体として見ずに、単なるナノ構造の材料だと思えば、一定の塩基配列をもつ DNA を混ぜるだけで、さまざまな形のナノ物体を作れる、ということに気付いたのである。

■ DNA によるモノづくり ～DNA 分子デザイン

実は、現在においても、望みの形や機能をもつタンパク質を作る（そのアミノ酸配列を決定する）ことは、非常に難しい問題である。アミノ酸は 20 種類あり、それを数百から数千個鎖につないだものがタンパク質である。したがって N 個のアミノ酸からなるタンパク質の配列は 20^N 通りもあり、この配列空間があまりにも莫大であるため、望みの配列を探し出すことができないのである。ところが、DNA の場合は、A,C,G,T の 4 種類しか塩基の分子がないので、その配列は高々 4^N である。これならばパソコン程度の計算力でも十分に探索可能である（☞ 63, 64）。1990 年代の終わりころから、このことを背景として、DNA だけを素材として、いろいろな分子部品をつく

る試みがはじまっている。これが、BIOMODの主題でもあるDNA分子デザインである。



■ 構造 DNA ナノテクノロジー (☞ 17)

DNA を使っているいろいろな形のナノ構造を組み立てるのが構造ナノテクノロジーだ。DNA オリガミと呼ばれる手法が代表的なもので、コンピュータを使って非常に複雑な形の分子を設計する分子デザインの中核ともいえる技術である。最近では DNA ナノ構造とタンパク質や脂質など他の分子を組み合わせる研究も盛んになっている。(☞ 49)

■ DNA コンピューティング (☞ 29)

DNA の相補性をうまく利用すると、溶液中のある DNA の濃度が論理演算の結果に対応するような反応系が作れる。この分野は最近急速に進歩していて、いまや数百個の論理ゲートを含むような複雑な分子計算回路をつくることができる。

■ 分子ロボティクス(☞ 24)

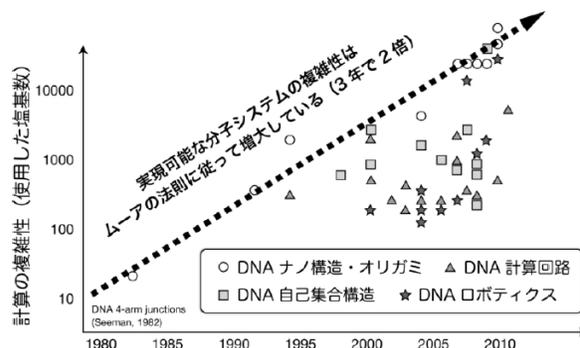
DNA で構造をつくり、それにセンサーやアクチュエータ、そして DNA コンピュータを組み合わせたものが分子ロボットである。分子ロボットは、環境の中で自律的に判断して行動するような分子サイズのシステムであり、たとえば、病気の細胞を見つけて薬を放出するといったことを目指している。構造 DNA ナノテクノロジーにより、静止した(static な)構造はある程度作れるようになってきているが、動く(dynamic な)構造の作り方はまだよくわかっていない。これからの研究分野だ。

■ DNA 分子デザインにおけるムーアの法則

ムーアの法則というのは、集積回路の実装密度が指数関数的に増加してきたという経験を法則にしたも

のだが、DNA 分子デザインの世界で、まさに同じことが起こっているのである。すなわち設計可能な DNA の塩基数はすでに数万のレベルに達しており、今後さらに増加していくだろう。大規模かつ複雑な人工物が分子デザインのレベルからつくられる時代がもうすぐそこまで来ているのだ。

DNA 分子システムの複雑化トレンド



コラム 分子ロボ研究会と分子ロボプロジェクト

DNA コンピューティングの研究は日本でも早い時期から行われている。Wiplash PCR(☞35)や DNA メモリ (☞28) はその成果だ。計測自動制御学会の調査研究会として 2010 年に発足した分子ロボティクス研究会は、DNA コンピューティングと構造 DNA ナノテックを融合させ、さらにロボティクスにまで発展させようという野心的なグループである。

<http://molbot.org/>

このグループが提案した科研費の大型研究プロジェクト新学術領域「分子ロボティクス」(2012 年～2016 年年度) が採択され、実施中である。

<http://www.molecularrobotics.org/>

その目的のひとつに学生の啓蒙、若手研究者の育成があり、BIOMOD の全面的な支援を行っている (☞ 2)。

参考文献

萩谷, 西川, DNA ロボット, 岩波書店, 2008 年
小宮他, DNA ナノエンジニアリング, 近代科学社, 2011 年

村田 智 (東北大学)

2. BIOMOD とは

これまでの大会の歴史、開催に至るまでの背景、日本のロボコンとの関連などについて解説する。

■ はじめに

ようこそ、BIOMOD へ。おそらく、このハンドブックを手にしたみなさんは、これから数ヶ月のあいだ、アイデア出しから最終発表まで、数々の試行錯誤を経ながら、いままでにない新しい分子ロボットやデバイスをつくるというまたとない経験をすることになるだろう。ただ具体的に何かをはじめその前に、まずはこの BIOMOD という大会について理解しておくことが大切だろう。本セクションでは、この BIOMOD がいかなる意図をもってどういう経緯で始められたのか、その背景について簡単に解説する。

■ 背景

ここ数十年の間にわたる分子生物学や有機化学などの発展で、生体分子についての理解は格段にすすんだ。なかでも目覚ましい発展を遂げたのが、DNA や RNA など、核酸やそれと関連した諸項目についての包括的な知識である。有名なワトソン・クリックの二重らせん構造の発見にはじまり、酵素による操作法の確立、人工塩基によるあらたな機能性の付与など、基礎科学の進展とそれを背景とした技術の開発が、現代のバイオテクノロジー・ナノテクノロジーというあたらしい工学の礎となっている。つい数十年前までは、工学という方法論では到底てなずけることができないと考えられていたこれらの対象も、我々は生物学や化学、情報工学などの発展のおかげでそれを理解し、この理解をもとにしてものづくりを利用しようとしている。そのような歴史的な転換点に、いままさにわれわれは立ちあっているのである。

■ DNA ナノテクノロジーと BIOMOD

核酸にまつわる科学が進展した結果、生まれたあた

らしい工学の分野のひとつに DNA ナノテクノロジー (DNA Nanotechnology) というものがある。DNA ナノテクノロジーは、もともと 1980 年代に米国の Seeman という化学者が、タンパク質の結晶化を促すための「ナノスケールの足場」を DNA でつくりたいか、という発想をしたことに始まる。DNA の二重らせんを組み合わせかたちを作るという彼の発想は、30 年余りの時とさまざまな研究者の試行錯誤を経て、Rothemund による「DNA オリガミ」(DNA Origami) とよばれる自在な形のナノ構造作製手法の開発に結実する。じつは「形状」だけではなく、核酸を利用した「センサー」として機能するアプタマーとそれを探索するための手法の開発、鎖置換とよばれる手法を用いた「情報処理機構」や擬似的な「駆動手法」の開発といったそれぞれの要素技術についてもひとつとおり出揃いつつある、というのが 21 世紀初頭の状況であった。(それぞれの技術の詳細、参考文献等については各トピック・コラムをご参照いただきたい。)

こういった技術的背景のなか、生体分子を扱う技術を駆使することで、生物とは異なる、ブラックボックスなしのシステムを分子レベルから設計して組み立てられるかもしれない、という発想に至るのは極めて自然な流れだろう。このような発想は次第に、先に紹介したようなセンサーや情報処理機構、駆動手法などの構成要素を、DNA を始めとしたさまざまな分子で作製し、これらをひとつに統合した「分子ロボット」をつくる、という具体的な構想として研究者の間で次第に共有されることとなる。日本でも 2010 年 2 月に「分子ロボティクス研究会 [1]」が計測自動制御学会の調査研究会として立ち上がり、この構想を実現するための準備を進めてきた。2015 年現在、この組織をもとにして新学術領域「分子ロボティクス」[2]が発足、BIOMOD 日本チームの参加

母体としても数多くの支援を行っている。じつはこの本も、この分子ロボティクスグループのメンバーとして活躍されている第一線の先生方のご執筆によるものである。

そのような状況の中、2010年、米国の複数グループより、DNAオリガミを構造の核とした、分子ロボットの「プロトタイプ」ともよべる例が発表された[3,4]。これが決定的なきっかけとなり、分子ロボット論文の著者のひとりでもある米国のDouglasにより2010年の末、はじめてのBIOMOD開催が世界の各研究グループに打診されることとなった。

■ 日本のロボコンとの関連

以上のような流れをひもとくとわかるように、このBIOMODとロボットという発想には密接な関係がある。開催の打診をうけ、日本の研究者たちがこの大会を作るうえでどのような点で貢献できるかを考えた際にも、その発想の根底としてあったのは、日本で盛んな機械系のロボコンの知見をいれることはできないか、という点であった。

当初の予定では、BIOMODは合成生物学における学生大会、iGEM (International Genetically Engineered Machine competition) [5]の仕組みをそっくりそのまま借用した大会形式を検討していた。分野を活性化するという側面から言えば、規格化された方法論を適用することで飛躍的に発展したiGEMの枠組みをそのまま利用し、DNAオリガミとそれを簡便に設計できるCADを同様な方法論として大会に適用することで、BIOMOD、ひいては分子ロボティクス分野全体についても同じ発展を期待できるだろう、というのがその理由である。

この内容に対し、我々日本の研究グループは、分野の発展という側面だけではなく、教育という観点からもこれを考えたうえで、評価のプロセスが少々不透明なiGEMの仕組みをただそのまま適用した大会とするのではなく、分子ロボコンに適した、参加する学生や教員にとってもより公平で見通しの良い大会に進化させたほうがよいのではないかと議論を

行った。やはりその背景としては、日本ではこれまで長年行われてきた機械のロボコンが定着していたことで、とくにiGEMを経験した国内の研究者を中心に、この手の大会の枠組みには改善すべき点があるというコンセンサスがあらかじめ形成されていたからではないかと考えられる。さらに今回は機械系のロボコンにより近いテーマ（分子でロボットを作る）であることも、この議論の後押しをしたといえる。

その結果、できるだけ公平な審査を行えるような評価基準の導入と、長期的にはより機械のロボコンに近い形で競技をおこなえる布石となるような、ロボコン型競技の試験開催・分子ロボティクス賞創設の提案を行うこととなった。分野の発展と次世代の研究者育成に適したiGEM型の大会形式に、これまで機械系のロボコンが培ってきた、オープンかつわかりやすい評価基準というエッセンスを導入するという、全く異なる出自を持つふたつの「ロボコン」の良い点を融合するような試みを提案したといえる。

これらの提案は採用され、点数に基づく評価基準については現在もほぼ同様の内容で運用されている。ロボコン型競技と分子ロボティクス賞については、2011年の初回に、全体の大会の枠組みの中でパイロット大会という位置づけで実施したものの、大会内でさらにロボコン型競争を行うにはいささか時期尚早であるという結論に至った。現在では、全チームのうち、分子ロボティクス分野の発展にもっとも貢献したプロジェクトに与えられる特別部門賞として、その内容は引き継がれている。

参考文献

- [1] 分子ロボティクス研究会 <http://molbot.org>
- [2] 新学術領域「分子ロボティクス」
<http://www.molecular-robotics.org>
- [3] Douglas, S. M. *et al.* Science 335(6070), 831–834.
- [4] Lund, K., *et al.* Nature 465(7295), 206–210.
- [5] iGEM <http://www.igem.org>

浜田省吾 (コーネル大学)

3. BIOMOD の評価システム

BIOMOD は Wiki, YouTube, プレゼンの 3 項目で勝敗が決まるが、勝つためには評価システムの理解が必須である。この節では BIOMOD にはどのような賞があるのか、どのような採点形式で賞が決まるのかについて詳しく説明する。

■ BIOMOD の評価概略

BIOMOD 参加チームは、プロジェクトの詳細を記した **Wiki** とプロジェクトを 3 分程度で分かりやすく解説したプロジェクトビデオ(**YouTube**)を、本大会の約一週間前にアップロードする。そして本大会において、12 分以内でプロジェクトについて **プレゼン**を行う。これらの 3 項目により、総合順位と金・銀・銅賞の受賞が決定する。

■ BIOMOD の賞の種類

締切までに Wiki と YouTube をアップロードしていければ**銅賞**、それに加えて 1 つでもパーツができていれば**銀賞**を受賞できる。さらに、銀賞の要件を満たした上で、トップ 50%に入ったチームには**金賞**が与えられる。

多くの賞は上位 3 チームに与えられる。Wiki, YouTube, プレゼンはそれぞれの点によって、総合順位はこれらの 3 項目の合計点で順位が決まる。いずれの項目においても、2016 年 3 月時点では、これらの主要項目において 1 位になった日本のチームは東北大チームのみである(2012 年に YouTube 1 位, プレゼン 1 位, 総合優勝、2015 年に YouTube 1 位, 総合優勝)。Wiki に関しては、2014 年東北大チームの 2 位が日本過去最高である。

総合順位には関係しないが、プレゼンに対して学生参加者が投票することによって決定する**観客賞**も存在する。例年、観客賞とプレゼン賞はほぼ同じ顔ぶれが並ぶ。

他に 2 つ、1 チームだけが受賞できる賞がある。参加者による投票で決まる**ベスト T シャツ賞**(日本では 2013 年に東工大チームが獲得)と、日本の分子ロボティクス研究会が後援する **MOLBOT 賞**(詳しくはコラムにて解説)がある。

■ BIOMOD の評価システム

総合順位は 100 点が満点であり、内訳は Wiki が 50 点, YouTube が 25 点, そしてプレゼンが 25 点である。各項目がどのような基準で評価されるかについては、評価基準(Judging)のページ[1]に全て記述されている。審査員自身も、このページに書かれている項目を読んで審査の仕方を学ぶため、評価基準を熟読してきちんと理解することが、きちんと評価される Wiki, YouTube, プレゼンを構築する道しるべとなる。

評価基準の理解は、コンテストを制覇するために最も重要なプロセスの 1 つである。世界を変えよう革新的なプロジェクトを成し遂げても、評価されるポイントを無視しては勝つことはできない。

■ 審査員の割り当て方

各項目の審査は BIOMOD 参加チームのメンターと、外部の専門家によって行われる。この審査は匿名で行われるが、自分のチームを採点することはない。各チームの Wiki と YouTube のセットにはランダムに 5 人の審査員が割りあてられる。一方、プレゼンはその場にいる審査員該当者が全員で採点する。いずれも、最高点と最低点をつけた審査員の点は除外され、残りの審査員の平均点で決まる。

■ Wiki の評価基準

Wiki はプロジェクトのアイデア(20 点)と、記述の質(20 点)、プロジェクトの達成度(10 点)に分けて採点される。

プロジェクトのアイデアは、①アイデアの質(5 点): 科学的もしくは工学的に興味深いものとなっているか?、②ゴールの明確性(5 点): 何を持ってプロジェクトが達成されたとするかをきちんと設

定してあるか，③プロジェクトの妥当性(5点)：設定してあるゴールに向かうため，ひと夏でできそうな解決法を用いているか？，④手法の質(5点)：提案する解決法は良いものか？エレガントか？革新的か？，に分けて採点される。

記述の質は，①明確さ(10点)：プロジェクトの背景と動機，手法，結果，ディスカッションが，よく記述され理解しやすい文章となっているか？図自体やその説明は分かりやすくなっているか？，②アクセスの良さ(5点)：生データやソースファイルに簡単にアクセスできるようになっているか？別の人間が結果を再現しようと思ったときに，迷うことなくできる記述になっているか？，③レイアウトの質(5点)：プロジェクトのページは明確かつロジカルになるような配置になっているか？，に分けて採点される。

達成度は純粋に「設定したゴールに向けて達成した割合はどれぐらいか？」が問われる。

■ YouTube の評価基準

全体的なインパクト(10点)，分かりやすさ(10点)，出来栄(5点)の3つで評価される。

全体的なインパクトは，「ビデオは興味深く面白いものか？視聴後，もう一回見たいと思うようなものか？」が問われる。きれいな映像，面白いと思わせる工夫，意外性あるストーリーが問われていると思えばよい。ちなみに4分を超えるようなビデオはもう一度みたいとは思わない場合が普通である。時間にも注意を。

分かりやすさは「いろんな種類の視聴者が見て分かりやすいようにできているか？」が問われる。基本，どのチームが行うプロジェクトも分かりづらいものなので，それを分かりやすく(=きちんと説明する，ではないので注意！)語る工夫が求められる。この点，歴代の1~3位のチームはいずれも良くできているので参考にしてほしい。

出来栄は「映像，音楽，画像はクオリティが高く，適切な解像度とアスペクト比が維持されているものか？」が採点される。大体的場合，他のス

コアが高いと高くつく。上位では差がつかない項目になるが，雑音の1つ，動画の乱れ1つで簡単に減点される項目なので，しっかり稼げるようクオリティを上げることが大事である。

■ プレゼンの評価基準

内容(10点)，出来栄(10点)，インパクト(5点)の3項目で評価される。

内容は「スライドは理解しやすいものになっているか？プロジェクトはしっかりとした動機と結果をともなって，筋の通った一本道の流れでもって説明されているか？」が問われる。出来栄は「よくリハーサルされていて，ほどよいペースでプレゼンが行われているか？観客ときちんと意識し，アイコンタクトをしっかりと取っているか？」が問われる。そしてインパクトは「プレゼンは聞いてよかったと思えるものか？面白いのか？賢いな，と感じるようなものか？記憶に残るようなものか？」が問われる。

コラム MOLBOT 賞

MOLBOT 賞は日本の分子ロボティクス研究会がスポンサーとなっている賞であり，その年のBIOMODにおいて最も分子ロボティクスに貢献したプロジェクトに与えられる。投票は審査員によってなされるが，本大会のプレゼンによって評価される。そのため，この賞をゲットするにはプレゼンでいかに分子ロボットを構築したか，ということアピールする必要がある。

この賞に関しては日本チームが強い。第三回までは全て日本のチームが制している。2014年に初めて日本以外であるコロンビア大チームが受賞した。今後，激戦となることが予想されるが，分子ロボットを創るテーマは難易度が高いため敬遠されがちであり，コンセプトが良ければ完成度が不十分でも獲得できる場合も多い。ぜひ，この本を読んだ諸君に狙って欲しい賞である。

参考文献

[1] <http://biomod.net/judging/>

藤原 慶 (慶應義塾大学)

4. BIOMOD Jamboree の一日

BIOMOD はアメリカのマサチューセッツ州にあるハーバード大学において Jamboree (ジャンボリー)が行われる[1]. ジャンボリーとは、日本語でいうならお祭りのように楽しむ大会、ということである。本大会、とも呼ぶべきこのお祭り前後の日々がどのようなものをここで紹介する。

■ BIOMOD ジャンボリー周辺のスケジュール

Wiki と YouTube をアップロードし、プレゼン準備に励む一週間を経て向かう先は BIOMOD の Jamboree(ジャンボリー、本大会)である。

ジャンボリーは主に 3 つの日程に分けられる。受付を行う初日、プレゼンを行う 2 日目、そして表彰式がある 3 日目だ。

■ 1 日目：受付

成田からの直通便、もしくはシカゴやミネアポリスなどで乗換えてボストンのローガン空港に到着。そこから Silver Line というバスのような列車で South station へ。さらに Red line に乗り換え Central 駅へ行く。ここから徒歩 5 分ほどで例年のメインホテル、Le Méridien に到着する。ホテルのロビーにて、チャリーカード(日本でいう Suica)と、ネームカード、そして BIOMOD オリジナル T シャツをもらえば受付は終了である。20:00 までに間に合わない場合はジャンボリー当日の朝に大会会場にて受付することになる。

初日は例年、ホテルの会議室がレンタルされていて、予約制ではあるがプレゼンの練習を行うことができる。ここできっちり練習し、最後の詰めを行うかが当日のプレゼンの出来を分けていると思われる。これに加えてホテルの一室で深夜まで練習するチームもいる。大会当日に練習しているチームは何かしらミスをする傾向が見てとれるので、前日までにきっちり準備しておこう。

■ 2 日目：ジャンボリー開始

2 日目、いよいよジャンボリーが始まる。ハーバード大学の 1 部屋に集合し、朝の 8 時頃からセッションが始まる。まずは Shawn Douglas 博士のあいさつから始まり、そして順々発表、となるの

が慣例である。発表 12 分、質疑応答 3 分のサイクルで、次々とチームが発表していく。発表は堅くスーツで決めたプレゼンスタイルを貫くチームや、緊張感伝わるチーム、仮装や小ネタにより会場を盛り上げるチーム、演劇や掛け合いのスタイルで聴衆の興味を引くチームがいるなど、まさにお祭りである。当日の雰囲気は BIOMOD の facebook ページ[2]に行き、写真を見れば十分に理解できると思う。

午前と午後に 1 回ずつ 15 分ほどの休憩時間がある。ここではコーヒーとお菓子片手に休憩したり、発表の直前であれば最後の確認を行うことができる。昼食は例年通りであればビュッフェ形式で、各々食べている。さすがに大会の最中であるので、ピリピリした雰囲気も強く、広く交流が行われる状況ではない。昼食の前後に陽気なカメラマンによる全体写真の撮影、休憩時間に個別チームの撮影が行われる。[2]がその写真である。

発表が全て終われば、その日は終了である。ボストンで有名なロブスターや、アメリカンサイズのステーキを食べに行くグループなど、自由に食を楽しむことができる。2013 年はジャンボリーの夜に交流パーティーが行われた。ただし 2014 年には行われず、今後どうなるかは不明である。

コラム 1 日が 25 時間になる日

例年、BIOMOD が行われる 11 月 1 日の夜は summer time が終了を迎える。これは、深夜の 2 時からもう 1 回 1 時が始まることを意味する。深夜であるため、ベルがなるとか、特別な催しなどは、全くない。しかし、日本では体験できない特別な夜であることは間違いがない。

■ 3日目：ジャンボリー終了

3日目は、2013年までは最初から、2014年からは2日目にあったチームのプレゼンの後に、メインスポンサーであるAutodeskによるセミナー、そして表彰式が行われる。表彰式ではまず銅・銀・金賞の順に発表され、賞状が渡される。次に、各項目やMOLBOT賞、総合順位などが順番に発表される。YouTubeに関しては2013年より上位3チームの受賞作品が会場の大スクリーンにおいて大音響と共に放映される。写真撮影はあるが、受賞チームのスピーチなどは現在のところない。

ジャンボリー終了後は、自由参加のWyss研究所の見学ツアーが組まれることもあるが、帰りの飛行機まで自由時間である。ハーバード大や、ボストンの散策にぜひ出かけよう。楽しみ方はコラムにて紹介しているので参考にしてほしい。

■ 他チームとの交流

BIOMODは色々な国の学生が参加している。ジャンボリー中の休憩時間、昼食時間、夜のパーティーなど、少しの勇気と英語力があれば、どこの国の学生と話すことも可能だ。日本人の諸君は内弁

慶さ・英語力の不安から消極的で内輪にこもる傾向があるが、ぜひ世界の様々な学生と会話してみよう。あいさつし、どこの国の大学か尋ね、自分らのチームはこうだがあなたのチームはどうかなど尋ねてみれば会話が始まる。相手のプロジェクトを知っていれば感心したポイントを述べてみると話が膨らむかもしれない。今まで見た中で、話しかけられてイヤがるチームは存在しない。強いて言うならば、英語を話したくない日本チームの諸君が最も会話をイヤがる集団に見える。

他の国と比べ、日本チームは日本チーム同士で固まって話す傾向がある。それゆえ、他の国のチームからすると話かけ辛い雰囲気があると思われる。なので、こちらから会話するしかない。世界大会に来たのに、日本人と仲良くなって終わったというのは悲しくないだろうか？ぜひ、世界を広げてみてほしい。

参考文献

[1]2016年よりハーバード以外の大学、アメリカ以外の国でも行われる可能性がある

[2] <https://www.facebook.com/biomod/>

コラム ポストンの楽しみ方

BIOMODが終われば長い戦いから解放され久々の自由の身！晴れ晴れとした気分でボストンを満喫できることだろう。お土産売り場やショップ、ごはん処などがずらりと並ぶクインシーマーケット、大リーグのレッドソックス本拠地セーフコフィールド、ボストン美術館など、観光名所がずらりと並ぶ。

大学巡りも楽しい。本大会の会場であるハーバード大学はレンガ風のクラシックで厳かな建物が並ぶ。リスがたたずみ雰囲気、過ごして落ち着くキャンパスである。少し足を運んだ先にあるマサチューセッツ工科大学(MIT)は見た目からして一風変わった建物が多い。中に入ると、これまたジョークで創成された芸術作品が置いてあることもある。ちなみにMITのセンスで作られた芸術作品が並ぶMIT博物館もオススメスポットである。また、この時期のMITではBIOMOD同様の学生大会であるiGEMが開催されている(注：2014年の大会よりMITではなくなった)ので、ふらっと訪れてみると世界が広がるかもしれない。

最後に、お土産を買う一風変わった場所を2つ上げる。1つ目が、ハーバード大の生協。広く、様々なお土産が売っている。Harvard Universityの文字が入ったパーカーは、多くの学生が買って帰るお土産の1つである。もう1つが、Le Méridienの隣には夜遅くまで空いている大きなスーパーがある。お酒は売っていないが、1Lサイズのエネジードリンクから、まさにアメリカというべきサイズのお菓子袋まで、さまざまなものが売っている。スーパーの値段のため少し安いのも魅力である。

藤原 慶 (慶應義塾大学)

5. 受賞プロジェクトから学ぶ必勝法

BIOMOD は生体分子を用いたデザインコンテストであり、非常に自由度の高いコンテストである。この節では、どういうプロジェクトが評価されたのか、どういう組立てがプロジェクトの評価が高かったのか、Wiki, YouTube, プレゼンの各項目ごとに、過去の受賞チームの内容を参考に説明していく。

■ 歴代の総合優勝プロジェクト

第1回から4回まで、総合優勝したプロジェクトを紹介しよう。1回目は医療応用に使えるようなDNA/RNA ナノ構造体である。siRNA という治療に使える可能性がある薬を保持したナノスケールの8面体が、細胞に実際に作用することを示した。第2回は細胞に穴を開け、能動的にDNAを運ぶDNA ナノ構造体のプロジェクトである。DNAの取り込みにポーターというDNAの伸び縮みを利用した取り込みシステムが特徴であった。第3回は生体でのイメージングに有用な素材であるナノダイヤモンドをDNA ナノ構造体と組み合わせることで、配置自由度を上げたシステムである。第4回はつながった物質の協同性を利用し、DNA ナノ構造体が環境中の物質を認識して「精度良く」光るセンサーである。

■ 評価されやすいプロジェクト

歴代優勝プロジェクトを見ると分かるように、共通しているのはDNAで創られたナノ構造体を用いていることである。そもそもBIOMODが設立されたきっかけ自体がDNAによるナノスケールでの自由自在な分子配置技術の発展であり、この技術を基盤にしたプロジェクトは高い評価を得られる傾向にある。

一方、BIOMODの例年の傾向として、評価が低いプロジェクト分野が存在する。これはタンパク質を主役としたシステムの構築分野だ。おそらく、生命の多くのシステムがタンパク質の組み合わせによって成り立っているため、生命を超越したものを組み上げないと設計が不十分と判断されるからではないだろうか。

評価が分かれるのがDNAの配列特異性により

論理演算やDNAの増幅を行う場合である。これはおそらく、審査委員の多くは設計と完成度が高い点を与えるものの、今ひとつ何をしているのかがつかみづらいため、プレゼンやWikiの分かりやすさの項目が減点されやすいからだと思われる。

A-B-C, D-B'-A'のような記号文字(専門の人はこの方が分かりやすいと言うかもしれないが、一般向きではない)ではなく、分かりやすい概念の図や喩えを用いることで補うのが良いだろう。

■ 評価されたWikiの例

全チームの過去のWikiは全て読むことができる[1]。もしデータを消しているチームがあってもそこはWiki。過去の編集を探ってアクセスすることが可能である。

良くできたWikiの例として、2012-2014のドイツDresdenチームや、2012の東工大チームのWikiなどがあげられる。BIOMOD必勝フォーマットというべきものは2012年のハーバード大チーム、2013年のLMUチーム、2014年の東北大チームのWikiである。特徴として、ゴールと結果がマッチしている上、1つ1つの審査項目に対して簡潔に述べてあり、採点上減点しづらい。

Wikiに関してはどこまで達成できたかを示す図を載せるのが良い。この場合、審査員はこの図を元にWikiのデータと対応させ、適切に評価することができる。達成図がないと、目的に対して到達できていないところを探す工程になりやすく、減点されやすくなる。

ここで夢のない話をすると、達成度と実現可能性が15点を占め、面白さや革新さの配点が5点しかないことから、そこそこ面白くて(面白さ3点)、現実的で達成度が高いテーマで12点ほど稼ぐ方

が全体としてのポイントが高くなる。なので、1つアドバイスするならば、医療や工業製品のように役立つまでの道のりが遠く(そしてありふれていて)減点されやすいものより、きちんと組み立てられるユニークな素材を組み上げる方が良い。

■ 評価された YouTube の例

YouTube に関しては、「ひたすらにキレイな動画で分かりやすく説明する派(キレイ派)」と「コメディで分かりやすく説明する派(コメディ派)」が優勝を争っている。ようは分かりやすいのは当たり前で、クオリティで勝負するか、面白さで勝負するか、のいずれかになる。2011、2013、2014 年は、前者が制し、2012 年は後者が制した。2 位以下はコメディ派が優勢である。

キレイ派で勝つために「穴のないプロジェクト案(こじつけではいけない)」と「ひたすらにクオリティが高い動画作製」が必須である。優勝を狙うのであれば、3D ならば 2013 年の、2D ならば 2014 年の優勝作品並みのクオリティが欲しい。

コメディ派で勝つためには、単なるギャグでは世界共通の笑いを得ることは難しい。シリアス系コメディ(代表例は 2012、2013 の東北大チーム)か、普通に面白い動画(代表例は 2011-2013 までの東工大チーム)を目指すが良い。

ちなみに、YouTube では必ずしも結果を語る必要がないので、プロジェクトアイデアは良いが結果が出ていないチームでも技術と脚本で制することができる。実験に詰ったら YouTube に全力を!

■ 評価されたプレゼンの例

プレゼンにおいては、学会発表ではない、ということを理解しよう。プロジェクトに興味があるとは限らない、そしていつも集中力があるわけではないのが審査員である。彼らにいかに魅せるか、それが勝敗を決める。そのために今までの上位チームは劇形式、グッズやキャラクターの使用、掛け合いなど、聴衆の興味を引くと同時に分かりやすく伝えるための様々な工夫を行っている。特に、2人以上の掛け合い形式を取り、片方が結論の穴

や理解できないところを攻撃し、それに対してもう片方がその問題を解決するよう話を進めると、聴衆の理解と共感を得られやすい。上記のような周到な準備は、プレゼンの出来栄の項目にそのまま評価されるようになっている。

スライド制作にあたり注意することは、どのスタイルでプレゼンを行った場合でも共通である。流れに関してはプレゼンの組み立て方の節(項目 10)を参考にしてほしい。加えて、今までの傾向から見るに、文字を減らしてアニメーションを多くした方が理解されやすいことも付記しておく。

発表時間は短い分には問題ない(長い場合は悪い印象になるため、減点される可能性がある)。東北大チームがプレゼン賞を制したときも、発表時間は 10 分程度であった。

どうしてもプレゼンの文章を覚えられない場合、人形が話しているように振る舞い裏でナレーターが読み上げる形式、メンバーが客席からカンニングペーパーを紙芝居で見せる形式、手や持ち物(うちわ、巻物など)に忘れやすい文が書いてある手法など、うまくプレゼンの一部に組み込んでしまう方法もあるので参考にしてほしい。

コラム 審査員を信用しないこと

学生諸君はよく誤解しているが、「書いてある」もしくは「説明した」から理解してもらえようと思うのは間違いである。審査員が 1 つのチームにかかる時間は非常に短く、通常 15 分、長くて 1 時間である。このような短い時間で審査員に「分かってもらおう」ためには、ロジックが明確かつ一本道であるだけでは不十分である。図だけ見て分かる、文章の長さが必要十分な長さに達するまで推敲されている、個々の実験を行う理由と結果から導かれる解釈がきちんと記述されている、1 度見ただけでプロジェクトが凄いと伝わるよう扉絵が工夫されているなど、様々なことに気を使わねばならない。

参考文献

[1] <http://openwetware.org/Wiki/Biomod>

藤原 慶 (慶応義塾大学)

6. BIOMOD カレンダー

この章では、主な日程を紹介すると共に、チーム作りを概説する。BIOMODは期限の決まったチーム競技であるので、どのようなチーム体制とするかは非常に重要である。集まったメンバーや、研究室のバックアップ体制によって、適切な形態が違うので、自分達の実情に合わせて、編成するのが良い。

■ BIOMOD の主な日程

BIOMODは春に始まり、初冬に終わる。短くも長い半年間であり、通常の授業に加えての活動となるので、日程は比較的タイトである。

大まかな日程は下記の通りである。

4月	チーム結成
6月	文献読み、アイデア出し
8月	実験開始
9月	国内中間大会@東京
10月	プレゼン準備
11月	本大会@ボストン

まず、4月にチーム結成がある。有志での参加、研究室での参加、等、色々な結成方法がある。チームメンバーは少なすぎず、多すぎず、が肝要である。BIOMODのホームページ(HP)では、10人以下を推奨しているが、4人から10人が適切な規模と思われる。チームメンバーのバックグラウンドには、できるだけ多様性が良いという考えと、ある程度均一な方がよいという考えがあるが、これは、チームの実情や好みによるので、どちらでも良いと思われる。多様性があると、色々な考えや手法を持ち込める反面、フォーカスがブレ、プロジェクトが発散してしまうリスクがある。一方、均一な集団は、意思疎通がしやすい反面、考え方が似たり寄ったりで、アイデア出しに苦勞する面もあるかもしれない。メリットを生かし、リスクを減らすにはチーム編成が重要であるが、項を改めて後述する。

チームが出来たら、次は、基礎知識の習熟(講義や教科書)や、プロジェクトアイデアを得るための文献読みである。東大柏チームでは、“細胞の分子生物学”

や“DNA ナノエンジニアリング”といった教科書を使用し、必要な章を割当て、発表してもらう形式を取った。ただし、座学の比重を高くしすぎると、プロジェクトアイデア出しにかかる時間・エネルギーが少なくなってしまう、また、授業の延長な感じとなりがちで、受身の態勢となりやすいので、注意が必要である。文献は、東大柏チームでは1人2報程度、持ち回りで紹介した。そして、これらの知識を元にアイデアを出していく。アイデア出しもプロジェクトの成否に重要であるので、項を改めて後述する。



夏休みになると、実験開始である。実験は、チームによって、全員がする場合と、実験担当者のみがする場合とあるが、チームの実情に合わせて、判断すれば良い。東大・柏チームの場合は、基本的に全員が実験をする形とし、夏休みは(お盆等を除いて)週3日以上活動とした(実際は、もっと活動しているメンバーが多かった)。

夏休みも1ヶ月たつと、国内中間大会である。例年、東大の本郷キャンパスで9月頭に開催されている。この国内中間大会では、チームの方針を決める事が主な目的であり、プロジェクトを完成させる必要はない。とはいえ、本番と同じ形式で採点されるので、それなりの準備は必要だ。また、発表は英語であるので、発表だけでなく、英語にも慣れておく

必要があるだろう。中間大会の結果は、必ずしも本大会の結果と相関しない。悔しさをバネに本大会で大活躍したチームも多数あるので、たとえ、中間大会の結果が悪かったとしても、体勢を立て直し、本大会に向けて頑張れば良い。

あっという間に夏休みが過ぎ、秋に入ると、本大会の準備である。実験にプレゼン準備だけでなく、wiki や YouTube の準備もしなくてはいけないので、かなり忙しい。上手く作業を分担する必要がある、チーム力が要求される。

本大会は、ボストンでの発表だ。外国チームを前に緊張するだろうが、どのチームも同じなので、出来るだけ準備して、普段の力を出そう。準備量は本番に如実に現れる。また、BIOMOD では、劇形式での発表が多いので、過去の発表を良く研究し、聴衆の心を掴もう。

■ チーム体制について

サークルやバイトと同様、一番重要なのはリーダーである。ただし、集まったメンバーによって、必要とされるリーダーのタイプが異なり正解はないので、基本は希望者にやってもらう事が良い。全体のリーダーの他に、東大・柏チームでは、実験リーダー等も置いた。これは、プロジェクト全体を統括するチームリーダーが実験のリーダーも兼ねると、実験の状況に引っ張られてしまい、冷静な判断ができないためである。BIOMOD は短期競技であるので、理想と現実、短期と長期のバランスを判断し、プロジェクトを出来る限り前進させる必要がある。その際、リーダーは、一歩引いた立場から、物事を判断できる形の方が良い。一方で、実験の遂行に責任を持つ実験リーダーも必要である。実験リーダーは、全体を俯瞰し判断しているリーダーとのコミュニケーションの元、実験をどのように進め、どこまでを目標とするかをメンターやTA達と相談しながら、決め、実際に実験をするメンバーと情報を共有しながら、進めると良い。その際、折に触れて、データの整理を心がけておく事が肝要である。というのも wiki の

作成も時間との戦いとなりがちであるが、イチから作図する場合と、既に図がある程度完成している場合では、雲泥の差があるからである。

■ アイデア出しについて

プロジェクトの成否はアイデアの良し悪しがかなりの比重を占める。であるので、アイデア出しにはできる限りのエネルギーと時間を割こう。

アイデアが全く浮かばない場合は、過去のプロジェクトを少し変えてみたり、皆でブレインストーミングをするのも良いかもしれない。あるいは、身近な事で解決したい事を探してみるのも一助である。ただし、ブレインストーミングは楽しいものの、様々なアイデアを言い放し、という状況になり勝ちであるので、整理する人を立てたり、翌週にフィードバックをする等の工夫が必要である。考えたアイデアは、未熟な状態でも良いので、皆の前で発表し、(可能であれば本番同様)、採点をしてみると、そのアイデアの強みと弱みをはっきりし、最終的に特定アイデアを選ぶ際の参考になると考えられる。東大・柏チームでは2-3人1組で毎週アイデアをプレゼンするというのを1ヶ月(週1回で計4回程度)、行い、最終的に投票でテーマを選んでいく。テーマが決まったら、メンターやTAと良く相談し、どのような実験をするか、どこまでを目標とするかを決めると良い。また、必要であれば、プロジェクトの途中で現実にあわせて、方向転換をする場合もあるかもしれない。国内中間大会はその良い契機となるので、十分に活用しよう。

参考文献

- [1] 細胞の分子生物学 第5版 ニュートンプレス (2015/1/12 に英語版は第6版が出版された)
- [2] DNA ナノエンジニアリング近代科学社 (2011/5/9) 小宮健(著), 瀧ノ上正浩(著), 田中文昭(著), 浜田省吾(著), 村田智(著), 萩谷昌巳(編集), 横森貴(編集); ISBN-13: 978-4764904026

多田隈尚史 (京都大学)

7. グループワークのテクニック

BIOMOD ではほとんど研究経験のない学部学生がチームを組み、半年でテーマ立案・計画・実験・資料作成・発表などを仕上げる。必勝には、このグループワークをいかに効率よく行えるか[0]が重要なファクターである。これまで有効であった／今後有効になるであろうテクニックを概観する。

■ グループワークとは

グループワーク（チームワーク）の起源は旧石器時代、集団で狩りを行った時代にまでさかのぼる。個々の力では太刀打ちできない大物を仕留める上で、参加者間の連携つまり組織の力が必須になる[1]。プロジェクト成功への3要素としてよく「人・物・金」が挙げられるが、人の連携で他の2つが活きる。

■ 分業しよう

万能の人と呼ばれたレオナルド・ダ・ヴィンチもひとりで BIOMOD には勝てないだろう。リーダー、デザイナー、実験係、Web 係、Youtube 係、BGM 係、CG 係、プレゼンターなど、活躍時期を考えて分業をしておくといよい。スタンドプレーから生じるチームワークだけ[2]で戦えるのが理想だが、プロジェクトの性質が明らかで、個人の特技が不明な場合に役割分担は有効。プロジェクトが進行したら、得手不得手から係の見直しも考慮しよう。BIOMOD 未経験の新人の得手分野は見えづらい。お互いの才能を見いだせるような雰囲気作りは大切。20歳あたりは個体の力がかなり面白く出てくるが、個人の力の加算を合計以上にするために、ミーティングと情報共有がある。

■ グループワークのサイクル

〆切まで（☞ 6）の間、「ミーティング（状況確認、分業、〆切確立）→個別作業（実験、データ処理、資料作成）→ミーティング→個別作業→ミーティング...本番!」となる。

■ ミーティングをしよう

脳が別なので、チームにはミーティングが必要になる。気軽に集まれて多少騒いでも大丈夫なミーティング兼作業場所の確保は重要である。大学のサークル部屋や有料会議室もあるが、アドバイザから遠い

場合は終盤苦勞する。東北大は学生居室の一角と恵まれており、身内ながらこれは羨ましい。ちなみに個人のアパート部屋はおすすめしないリストのかなり上位だ。場所の装備として、速いインターネット回線、そしてホワイトボードは必須。磁石で紙資料も貼れる。デジタル黒板など全デジタル記録は魅力的だがまだ高価で応答が遅くテキストと図との混在書きの認識が悪い。紙資料もホワイトボードも携帯電話で撮影してデジタル化→共有、が簡便。ミーティング頻度は週1回、秋から終盤は週2回～随時、というのが東北大での経験である。カレンダーをミーティング場所の全員の見易い位置に11月まですべて並列に張り出すとスケジュールの共有がしやすい。週単位で数えると短期決戦が実感できる。アドバイザ先生の予定も記入できて便利。

■ ミーティングの内容

全体スケジュール／現在の課題／工程表／各人役割分担の確認、情報共有と対応策の議論。アイディア出しは最重要な課題と考えられがちだが、後述。

■ ミーティング進行のポイント

- ・司会・仕切りはリーダー。面白い奴でなくていい。
 - ・記録係は必須、ミーティング直後に全員回覧。
 - ・資料は人数分準備しておく。スライドだけで一方通行の情報伝達は不足である。
 - ・問題点は整理しておく。
 - ・先送る場合、期限と担当者を決める。
 - ・参加してくれたアドバイザに感謝。
 - ・個人攻撃はしない。
 - ・ミーティング後に議論を蒸し返さない。気になる場合は課題として次のミーティングで。
 - ・時間>>>>(越えられない壁)>>>>お金
- 定期的なミーティングは気配りの機会にもなり、メ

ンバーの心と体の健康にも良い。元気に戦おう。

■ アイディア出し

BIOMOD はアイディア命、だとよく言われる (☞ 12)。確かにアイディアが秀逸だと盛り上がるし半減期が長い、学部生がプロと被って勝負になるかも、というあたりも異様に楽しいところだ。なので、ブレインストーミング (☞ 13) はミーティングと別に時間をとることをおすすめする。しかし実現可能かどうかの検証、というハードルが最も高く時間を要する。妄想を高め合える仲間は貴重だが、ミーティングで必要以上に時間を長引かせないことが重要だ。個人の力として、持ち寄ったアイディアを披露し切った時点で、すぐに善し悪しが判断できないようであれば力不足。宿題として練り直すか、筋がよさげであればアドバイザーに投げるかしよう。もちろん、アドバイザーの予想を超える (出し抜く) ネットができればより楽しい。科学が本職のアドバイザーは、既存の常識を出し抜いて評価されてきた人々なのだ、出し抜かれて嬉しくない筈がない。

■ 情報を共有しよう

情報が共有されないと、お互い知らずに同じ作業を行う・繰り返すなど悲劇が生まれる。人対人の通信手段が多様な時代である。ミーティングの日程や場所、出欠連絡などに必要な全員の連絡先を把握しておく。個人情報管理は注意しよう。

- ・ e-mail : 必須。礼儀正しく。メールリグリスト宛のファイル添付は避ける (クラウドへのリンク推奨)
- ・ Twitter : 速い。安定。告知用。議論に不向き。
- ・ Facebook : まあ速い。論文紹介やミーティング前後での相談など。生実験データ置き場には向かない。
- ・ Line : 速い。安定。連絡用。潤滑油役。
- ・ Skype ほか TV 会議システム : 基本個人 vs 個人での情報交換。事前準備されたデータの確認と方針相談。意思決定が電話より早い気がする。顔の効果か?
- ・ Google ドキュメント : 速い。まあまあ安定。同時編集が可能なので、Skype チャットしながら参加者みんなで議事録編集合戦をすることはできる。これをプロジェクトに映し出してアイディア出しをすると

よいかもかもしれない。いま思いついた。

・ Evernote : 強力メモツール。速い。グループ共有機能は 2015 年 3 月現在まだ重い。

・ 訪問 : 超有効。親しき仲にも礼儀あり。初対面や忙しい相手には事前のアポとりと時間厳守が必須。

・ 電話 : 早い。安定。しかし手軽なのに強制的に相手の時間を奪う、諸刃の剣。緊急時は迷わず電話。

■ データ共有の手段

グループワークでも BIOMOD でも、材料のある者が生き残る。実験ノートは必ずつける。実験データや発表用データなど、デジタルデータは参加者全員がアクセスできるクラウドストレージが便利。誤って消去しないよう編集には十分注意する。

Google Drive 無料 15GB, One Drive 無料 15GB, Drop Box 無料 2GB, iCloud 無料 5GB などがある。自前のサーバは安全だが管理が大変な仕事。東北大では歴代 Google Drive を使用している。データを上げたらその連絡を忘れずに。取り扱うファイル形式の統一は重要で、終盤の編集合戦で効いてくる図の背景は「透明」、静止画は PNG が軽くておすすめ。動画は (☞ 9,59), 静止画は (☞ 56,57), その他重要コンテンツについては (☞ 54,56) を参照されたい。

■ さいごに

BIOMOD は他人に評価される大会である。よりよく評価されるためには、あらかじめより多くの人に評価を仰いで、対策を講じておくべきである。様々にいただいて出尽くしたコメントから何を選び何を捨てるのか、がチームにかかっている。本番で貰うコメントに初見のものがあるようではだいたいまずい。ツッコミと受けはチーム力として日々鍛えておこう。参考文献

[0] 組織論はビジネス書コーナーに山積みなので、街の図書館でからだにあったものをえらぼう。

[1] 孫武「故に善く戦う者は、之を勢に求めて、人に責めず」孫子、五勢篇、(-515)。

[2] 攻殻機動隊 S.A.C., 5, (2002)。

野村 M. 慎一郎 (東北大学)

8. Wiki 作成テクニック

Wiki は BIOMOD コンテストにおいて、配点比重が高く、非常に重要である。また、レイアウトも含めてチームの個性が顕著に現れるので、十分に注力すべきである。具体的操作は 53-59 章も参照の事。

■ Wiki について

Wiki は、総合点 100 点のうち、50 点をしめ、勝敗の鍵を握る。コンテストで良い成果を上げるためには、いかにわかりやすく、面白い Wiki を構築するかが重要である。

Wiki の配点

- ・ アイデアについて(20 点): 良し悪し, 実現可能性等
- ・ 記述(20 点): 見易さや, 的確な記述がなされているかどうか
- ・ 達成度(10 点): 目標を達成できたかどうか

■ Wiki の構成について

Wiki は複数のページから構成した方がわかりやすい。大体の構成は下記ようになる。

1. トップページ
プロジェクトの概要と成果が一目で分かるように、図と YouTube から構成される場合が多い。プロジェクトの概要が分かるようにしているチームもある。
2. プロジェクト概要
背景や目的を記す。図を交えながら、簡潔に記す。特に、”なぜ、DNA ナノ構造体を用いる必要があるのか”をわかりやすく記述できていれば、なぜ、そのプロジェクトを行う必要があるのかが明瞭となる。
3. 実験・計算
単にやった事を並べるだけでなく、story だてて、わかりやすく図を並べる。図が多くなりすぎる場合はメインでない図を supplement(補章)に載せるのも 1 つの手。
4. ディスカッション
当初の目論見どおりプロジェクトが進む場

合は非常にまれである。今後の BIOMODer, あるいは BIOMOD のページを参考にする研究者等の参考となるために、プロジェクトで得られた点と、課題を整理して、記述すると良い。

5. プロトコル

論文同様、Wiki も、見た人が追試できなければ、せっかくのプロジェクトが埋もれてしまう。できるだけ、丁寧に、わかりやすく、プロトコルを記載しよう。上手くまとまっていると、来年以後の後輩が参考にしてくれます。

6. チームについて

チームのメンバーについて、紹介する。また、BIOMOD では、様々な場面でスポンサーの方々のお世話になっているので、スポンサーの方がに対する謝辞やリンクも忘れずに記載する。

■ Wiki の作成方法

OpenWetWare を用いる方法と GitHub を用いる方法がある。

OpenWetWare は直感的に操作でき、また、第一回大会から用いられてきたので、スクリプトも含めた蓄積がある点が良い。さらに、画像や動画も簡単に取り扱える。ただし、同じページを複数人で編集ができないので、締め切り間際には、声が届く場所で作業をしないと、作業効率が悪い。

GitHub は、2014 年度から導入された方法で、複数人による同時編集が可能であったり、また、変更履歴が残っているので、間違っても変更してしまった際に簡単に元のバージョンに戻すことができる。あるいは、変更箇所の色をつけてピックアップ

プ表示してくれるので、複数人での編集に便利な点にある。一方で、HTML に習熟する必要があるため、ある程度スキルがある人物が集まっているチーム向きかもしれない。

■ Wiki 作成のコツ

Wiki 作成は、本番直前だけに作業をすればよいわけではない。普段から、得られた結果を加工しておく事が、効率の良い Wiki 作成には肝要である。そのためには、実験を始める前から、あらかじめ、story を示すためには、どのような結果を得る必要があるかを考え、想定図を書いておくが良い。初めはなかなか想像ができないかもしれないが、過去の文献を参考にしたり、メンター、TA のアドバイスを得ながら、準備する。このトレーニングは研究室に入った後も役に立つので、普段から意識した方がよい(ゴールから逆算して行動する)。

また、テクニカルなポイントとしては、あらかじめ、Wiki に up する図の体裁(サイズ、フォント)を決めておき、Wiki 担当者等に集めておくと、効率の良い Wiki 作成が可能となる。その際、図のタイトルや説明、考察等も添付しておく、図の加工・upload する担当者に情報を上手く伝達でき、作業の際にいちいち説明する手間が省ける。

Wiki のもう一つの難関が英語である。分かりやすい英語を書くためには、文献を良く読み、テクニカルタームや表現に慣れるとともに、早めにメンターや TA 等に原稿を渡して、手直ししてもらうと良い。

参考文献

[1] Wiki 関連

HTML5&CSS3 レッスンブック, ソシム (2013/5/24) ; エビスコム (著) ISBN-13: 978-4883378722

どんな色でもカラーコードに変換してくれるサイト

<http://html-color-codes.info/japanese/>

また、web 検索や、過去 iGEM や BIOMOD のサイトも参考になる。例えば、下記サイトでは小技が掲載されている

<http://2008.igem.org/Team:Chiba/Internal/foredit>

[2] 動画関連

Premiere Pro CC スーパーリファレンス for Windows&Macintosh, ソーテック社 (2013/8/20) ; 阿部信行 (著) ISBN-13: 978-4800710048

AFTER EFFECTS ANIMATION ABC, 翔泳社 (2007/3/16); AC 部(著) ISBN-13: 978-4798112992

[3] Maya 関連

Maya 教科書 1 - モデリング&質感設定の基礎 -, ボーンデジタル (2009/11/26); 川上理恵(著), 村上和徳 (著), 加藤諒 (編集) ISBN-13: 978-4862461100

Maya 教科書 2 - キャラクター制作&アニメーションの基礎, ボーンデジタル (2010/3/26); 川上理恵(著), 河野紀子(著), 村上和徳(著), 加藤諒(編集) ISBN-13: 978-4862461117Autodesk Maya ビジュアルリファレンス 3 (ビジュアルリファレンスシリーズ), ワークスコーポレーション (2011/9/28); 田中憲二ら (著) ISBN-13: 978-4862671141

多田隈尚史 (京都大学)

9. YouTube ビデオ作成テクニック

「良い」動画をつくるのにも、ある程度方法論というものがある。審査員にあなたのプロジェクト内容を説明する入り口となるこの YouTube ビデオ、その作成のヒントをご紹介します。

■ なぜビデオが大切なのか

BIOMOD がほかの学生コンテストと一線を画す評価基準、そのひとつがこのビデオ審査である。プロジェクトの内容を紹介する 2-3 分程度のビデオを、Youtube や Vimeo などのオンラインビデオサイトにアップロードし、その内容で点数が決定する。採点基準は以下のとおり：

オンライン・ビデオ (全 100 点中 25 点)

- ・ **全体のインパクト** Was the video interesting?
Did you want to watch more than once? (10 点)
- ・ **明瞭さ** Was the project described in a simple and clear manner that could be easily understood by a wide audience? (10 点)
- ・ **品質** Was the sound and video high quality?
Were the images focused and scaled properly? (5 点)

ビデオは、あなたのプロジェクトを紹介する入り口となる。第一印象は大切だ。大体の人はまずビデオをみて、もっと詳しい内容まで真剣に読むかどうかを決めてしまう。そう、それは審査員とてある程度は同じだといえる。彼らだって時間のないなか採点をしているわけで、最初のビデオが分かりやすいと、それだけで Wiki やプレゼンの理解度、読む/聞く気までもが変わってきてしまう。チームにとっても、わかりやすく印象に残るムービーを作っておけば、その後に続く Wiki でも説明がしやすいだろうし、プレゼンでの話運びも断然楽になるだろう。本章では、BIOMOD 動画制作のヒントを、流れに沿ってご紹介しよう。

■ ストーリー

どんなにきれいなグラフィックを駆使してムービーを作ったとしても、一番大切になるのはストーリーだ。プロジェクトの内容を明快に説明しつつ、

かつインパクトのある話にするというのが、良いビデオを作るうえで最も大事な点である。

じつは、プロジェクトの内容を決めるアイデア出しの段階で、これはもうある程度決まってくる。頭の片隅で、動画にしたら面白くなりうるか（もしくは、このアイデアをどうやったらインパクトのある内容の話にすることができるか）、というのをプロジェクトのブレインストーミングの段階から常に考えておくようにしよう。

■ 計画

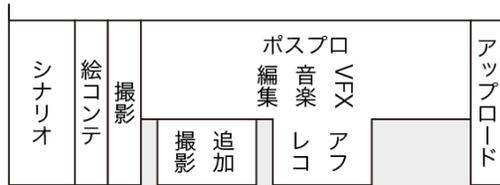
これまでの様子をみるに、大概最後残り 1 ヶ月くらいになってから、慌ててビデオをこしらえるチームが多い。よっぽど慣れていない限り、これはできるだけ避けたほうがよい。オススメは、アイデア出しの前後、それぞれのメンバーの性格や趣味がわかってきた時点で、まずは責任者(監督)を指名しよう。監督は、これまでのビデオを観て勉強するとともに、自ら手を動かして、カメラワークや動画編集などの練習をしておくのが良い。(もし音楽や CG の担当も兼ねるようなら、その練習も始めなければならない。) 試しにミーティングの内容をドキュメンタリー風に撮って、それを編集してみるのもいい練習になるだろう。遅くとも中間発表後(場合によっては内容の立て直し後)には、プロジェクトの具体的なテーマもほぼ固まるだろうから、そこで本番制作に移行できるくらいのノウハウが蓄積されているのが理想である。

実際の制作に入る際、気をつけておきたいのがスケジュールだ。制作を開始した後、はじめの **2 割の時間で 8 割の素材を揃える** つもりで予定を組もう。最後の追い込み時期は、大概、実験や Wiki を書くのに時間をとられてしまう。ある程度やる事が決まっているビデオから先に手を付けてお

くと、後々が楽になる。通常の短編映画制作の流れに沿う場合、作成の工程はおおよそ下記のようになる。

中間発表

更新締切



■ シナリオ（脚本）

まずは、どういうテイストの、どういった話にするかを具体的に決めなければならない。そのために大切なのがシナリオだ。これをキチンと練っておくのが、動画制作のプロセス全体をスムーズにすすませる秘訣である。もちろん、その他の審査項目での話運びにも影響してくるので、チーム全員が納得できる内容、かつわかりやすい説明の仕方しておく必要がある。シナリオ・コンペティションをやって、皆から案を集め、そのなかから選ぶというのも良いだろう。オリジナリティという点ではあまり褒められたものではないが、演出の下敷きとして、ジャンルの定番フォーマットを拝借してしまうというのも手だ。3分という短い間に観客にノッてもらうには、みんなが知っているゲームや映画、ドラマなどからスタイルを引用する、というのわかりやすいだろう。（いずれにせよ、このプロセスを楽しもう。）

監督は、内容のインパクト、説明のわかりやすさについてはもちろん、これまでに蓄積したノウハウから、現実的に実現可能な内容かどうかという点についても、この時点でシナリオの修正をきちんといれていくのが大事だ。説明でCGカットの多用が難しいのであれば、その他の手段に切り替える、数を絞るなど、臨機応変に考えよう。また、台詞を出演者のあて書きにしまうなど、素人であっても成立する演技内容にする工夫をしてもよいだろう。ちなみに、学外ロケは時間がかかる場合が多いので、やるのであれば、なるべく

コンパクトに撮影をすませられるよう、撮影プランを考えつつ脚本を練ろう。グリーン/ブルーバックは便利だが、ポストプロで時間をとられることを念頭において組み込む必要がある。

出演者が決まり次第、一度は脚本のあわせ読みをすることをおすすめする。とくに字幕でなく、英語で台詞を話す場合は、各出演者がきちんと練習しておくことが必要だ。監督は、ここで出演者の話し方をきちんと聞いておいて、次の絵コンテに反映させる。もし英語をしゃべるのがどうしても無理ということであれば、台詞全てを英語字幕にするという手もあるだろう。その場合、日本語のオリジナル脚本をもとに字幕脚本をつくっておくことが必要だ。（その場合は、画面上でぱっと文意がとれるくらいの長さの英語にしておこう。）

■ 絵コンテ

シナリオが決まった時点で、ある程度全体のかたちは見えているが、監督にはさらにもうひと段階、撮る前の準備が必要だ。それが絵コンテである。シナリオを具体的なカットに落としこむ（カット割り）ことで、どういった撮影手法でとるか、どういったSEやBGMが必要かといったことなどを具体的に決めていく。カットを決めたら、ストップウォッチ片手に、各カットの台詞とそこでの出演者の演技を想像して測ってみることで、尺のながさや、そこでの演技のタイミングや動きなど、ディレクションもある程度ここで定めていく。字幕を出すのであれば、カットや台詞の長さに対して不釣り合いなバランスになっていないかも、ここで確認しよう。（実際には、ここまで細かくやらずに、一気に撮影に入る監督もいる。ただBIOMODの場合は、全体の尺と製作期間が予め決まっている点でシビアであるということもあり、とくにはじめて撮る場合は、このプロセスを踏むことなるべく具体的なイメージを持っておくと、いざ撮るときに迷いが無いだろう。）この時点で、動画全体が監督の頭のなかで再生できるようにするとともに、撮影に協力する出演者やスタッフと

も具体的なイメージが共有出来るようにする。必要な小道具などがもしある場合は、ここで並行して作っておこう。CG 担当や音楽担当がいる場合は、ここで作り始めてもらう。それぞれのカットの長さを合計して、全体の尺にはまるかどうか、また、それぞれのシーンの長さのバランスといったところも確認しておこう。

■ 撮影

撮影は短期集中、なるべく短時間でまとめて撮り終えるのがセオリーだ。まずは絵コンテのどのカットをどの順番で撮っていくか、計画をたてよう。すでに絵コンテでそれぞれのカットのディレクションがきちんと定まっているので、必ずしも頭から順番に撮らなくても大丈夫。基本的には、すでに頭のなかにある絵のイメージに近づけるように撮るわけだが、そこで発生する当初の目論見とは外れた演技なども、良いものであれば柔軟に拾っていきこう。風景撮りなど、簡単な同時進行可能なカットがあるのであれば、誰かにお願いするのも手だ。

■ ポスプロ（編集・音楽・特殊効果）

まずは撮った素材を、粗削りでもいいので、当初計画した通りに並べて全体をみてみよう。（撮影しながら並行してやるのも可。）足りないカットがあるようなら、この仮編集の時点で追加撮影していく。パズルのピースをはめ込んでいくように絵コンテにそって採用カットをいれつつ、それぞれの間を微調整していくことで、全体のバランスと各カットのテンポを整えていく。音楽もまずはラフに並べ、そこからこまかくタイミングや音楽自体の編集を入れていく。音楽にカットを揃えていくと、全体がしまって見える。（音楽担当がいない場合は、Garageband などについてくるループや、オンラインにある著作権フリーの音楽を活用しよう。）なお、特殊効果作業があるようなら、カットごとに細かくわけて並行して行っていくとよい。ある程度整ったら、動画に合わせて出演者にアフレコをしてもらい、音質を高めるのも大切だ。ま

た、区切り区切りで他のメンバーに見せて、フィードバックをもらうようにしよう。話運びや説明に飛躍がないかなど、編集者自身ではみえにくい点を指摘してもらって改善するようにする。（大概の分かりにくい点はシナリオを書いた時点で排除されるのだが、テンポやカットのつなぎ方、演出の仕方によっては、案外意図しない方向に観客が解釈してしまうときもあるものだ。）それぞれのカットが未完成でも、全体のカット運びさえ形になっていれば、早い段階からこのフィードバックが得られるので有利だろう。

■ まとめ

ビデオをつくるうえで、なぜこれが大切なのかという点に始まり、実際の制作の流れにそって、BIOMOD 動画制作の初歩的な方法論をおおまかに紹介した。もちろん、これらをすべてやらなければいけない、というわけではないのだが、こういったプロセスを念頭に置いてつくるだけで、ビデオの出来というものも変わってくるだろう。審査員も観客も、あなたとおなじ人間だ。なにより、自分たちが観て気持ちよく楽しめるものにするという点を忘れずに、分かりやすく面白い動画を作ってください。

浜田省吾（コーネル大学）

10. 英語プレゼンテクニック

日本人にとって、BIOMODの最大の難関は、英語でのプレゼンテーションである。ここを乗り越えないと、上位入賞は難しい。はじめてのプレゼン、しかも英語で。質問がわからなかったらどうしよう？不安要素はいくらでもあるが、準備あるのみ。

■ しっかりしたロジックがあれば何とかなる

英語のプレゼンテーションの難しさは、実は英語の難しさではない。発表のロジックをしっかり組み立てられるかどうか、という点が大事なのである(☞12)。ロジックがしっかりしていれば、それを英語にするのはそんなに難しくないのである。しかも、発表のロジックにはあまりバリエーションはなく、次のような骨組みを考えておけば間違いない。

動機や背景：なぜそのテーマを選んだか

目的：どういう目標設定をしたか

方法：それをどういう方法で解決しようとしたか

結果：その結果どうであったか

この骨組みは、国語の作文で習う「起承転結」とは全く異なることに注意してほしい。作文では「転」、つまり、場面や主題の切り替えが許されるが、プレゼン、特に英語のプレゼンでそれをやってはいけない。あくまでも最初に定めたテーマをまっすぐに展開していくことが求められる。むしろ起承「展」結なのである。

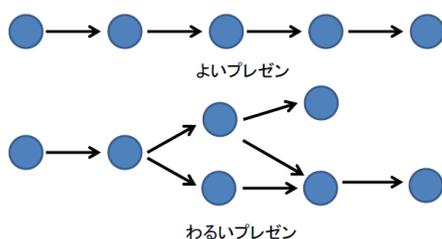
起 動機や背景の説明

承 それをうけて何をテーマにするか(目的)

展 テーマの内容を展開(方法と結果)

結 得られた結果から何がいえるか、どんな未来が拓けるか

この「まっすぐさ」を図に書くとこのようになる。



■ プレゼンの演出

BIOMODのプレゼンと、一般の学会発表には大きな違いがある。学会発表であれば、研究した内容とその価値をなるべくわかりやすく伝えればよいのであるが、BIOMODは学生コンペとしてもっと自由にやってよいし、その工夫も評価される。実際に、プロジェクトの内容をいかに印象深く、面白く伝えるかという観点が評価基準に入っている(☞3)。そこで大切になってくるのがプレゼンの演出である。

いろいろな演出の方法

物語性：何かのストーリーをつける。

対話形式：複数人の掛け合いにする。

扮装：(途中から)パペットや着ぐるみで登場する。

映像：ビデオプロジェクトをうまく使う。

笑い：ユーモアやウィットを利かせる。

聴衆参加：聴衆に体を動かしてもらう。

演出として、動機や背景を何かのストーリーに仕立てるといことがよく行われる。たとえば、「ある犯罪者集団が、危険なウイルスを製造した。そのウイルスはこれこれの性質をもっている。急いでそれに対抗する手段を開発しなければならない。そこで我々は・・・」といったストーリーである。こういったストーリーはテーマに対する興味を掻き立てるし、ストーリーに起伏を持たせることでプレゼンを飽きさせないという効果を生む。

また、通常の発表であれば、研究者本人が発表するが、ストーリーがあれば、登場人物を複数使える。複数の登場人物の会話形式でプレゼンを進めることで、聞き役が聴衆の代わりに疑問を發し、それに対して答え役が答えることにより、わかりやすいプレゼンを組み立てられる。日本人にとっては、英語のセリフを覚える負担が減ることにもなる。

もうひとつぜひ加えてほしいのは、「笑い」の要素である。聴衆を上手く笑わせることができれば、そのプレゼンはかなり成功しているといえるだろう。しかし、何でも笑わせればよいというものではない。社会的なタブー（性や宗教に関すること等）に触れる内容や、他のチームの迷惑になること（紙吹雪等）、などは、かえって響きを買うので気を付けよう。自チームのグッズを配ったりするのもお勧めできない。

BIOMOD では、これまでにもいろいろな演出が試されてきたが、2014年には聴衆を動員するチームが現れた。プロジェクトの内容に関連した動きを聴衆にさせる（客席でウェーブさせたり、聴衆の上に風船を置いて運ばせる）ことで、プロジェクト内容をわかりやすく伝えることに成功している。ぜひこれらを超える新機軸を考え出してほしい。

■ とにかく練習・練習・練習

英語のプレゼンを成功させるには、練習しかない。英語のプレゼンでは eye contact ということがやましくいわれ、つねに聴衆を見ながら話すことが要求される。したがって、話者は原稿を見ることができないのでセリフを覚えねばならず、そのためには、セリフはよく練られ、かつ簡潔なものでなくてはならない。メンターやネイティブの人にあらかじめ台本を見せてアドバイスをもらおう。現実には難しいかもしれないが、Jamboree の1週間前にはプレゼン内容が決まっていることが望ましい。

台本がきまったら、セリフをゆっくりと、間を置いて、しゃべる練習が必要である。間違った発音やイントネーションだと伝わらないので、はやめに英語のわかる人に聞いてもらって矯正しよう。そして時間を計りながら、何度でも繰り返し練習しよう。練習すればするだけプレゼンの質はあがる。行きの飛行機やホテルの中でも練習はできる。直前まであきらめずとにかく練習しよう。（発表はスライドと連動する必要があるため、スライド係の人も何度か一緒に練習すること。）

■ もう一つの難関 ～質疑応答

プレゼンが終わった。聴衆も熱心に聴いてくれたようだ。そうすると、次は質疑応答である。質疑応答そのものは評価項目にはないが、審査員の印象はこれに大きく左右される。はっきりいって英語国民でない日本人は極めて不利である。まず、何を質問されているか聞き取れないし、聞き取れたとしてもどうこたえてよいかわからない。ステージ上でこそそこそと目配せしあいながら、気まづい沈黙が続く・・・最悪な状況はこんな感じだろうか。そうならないためにどんな準備が必要か要点を示しておこう。9月ごろにおこなわれる国内大会でも、プレゼン、質疑応答ともにすべて英語で行われるので、ここで本番の雰囲気をつかんでおくとよいだろう。

質疑応答対策のポイント

- ・ 想定問答集をつくる。
(難しい質問への答え方なども考えておく)
- ・ 質問ごとに担当者を決め、自分の質問が来たら3秒以内に答えられるように練習する。
- ・ 留学生など、英語の得意なメンバーを回答者として訓練しておく。
- ・ 国内大会は予行演習。何が足りなかったか反省したうえで本番の準備をする。

参考文献

英語プレゼンの参考書はたくさん出ているので、プレゼン担当者は何冊か目を通しておくこと。
井口, 英語で科学を語る, 丸善, 1987年
中村, 英語口頭発表のすべて, 丸善, 1982年

村田 智 (東北大学)

11. BIOMOD で得たもの、得られるもの

BIOMODは夏休みを潰して取り組むだけでは足りず、9月と10月も勝負の日々が続く。時間との闘いの中で、ときには徹夜、ときにはチーム内でもめることもあるかもしれない。そこまでして得たものは何か、得られるものは何か。学生が寄せた感想文と、メンター視点からのコメントより感じ取って欲しい。

■ 実際に BIOMOD を行った学生の感想は？

BIOMOD が一体どのようなものか理解するには、過去に参加した学生たちの生の声を聞くのが一番良い。過去に参加した多くの日本人学生の感想は、新学術領域「分子ロボティクス」の HP[1]にあるニュースレターのページにて読むことができる。以下に、2人の感想文を取り上げる[2]。

■ 片山 航一郎 君 (2013 Team Sendai)

この半年間を振り返ってみると、寝ても覚めても頭の中は BIOMOD で一杯だった。どうやって実験を成功させようとか、あのプロトコルを少し変えてみようとか、Wiki のあの記事まだ書いてないとか、プレゼンのスライド終わってないとか、いつも BIOMOD のことばかりだった。これほど没頭していたのはなぜだろう。連覇のプレッシャーから？上級生としての責任から？確かにこれらもあったのかもしれない。しかし何よりの理由は本当に楽しかったからだ。

BIOMOD の最も大きな特徴は、「ゼロから作り出す総合的プロジェクト」であることだ。どんなものを作り出すのか、どんなことを成し遂げるのか、すべて自分たちでアイデアをひねり出し、設定した目標に向けて試行錯誤を繰り返していく。そしてただ実験を成功させるだけではなく、自分たちのプロジェクトを分かりやすく魅力的に伝えるための Wiki や YouTube video, プレゼンテーションを作らなければならないのだ。多種多様なスキルが要求され、チームの総合力が試される。苦労もそれだけ多かったが、それ以上に BIOMOD にやりがいを感じ、チームメンバー全員で真剣に取り組むことができたからこそ、終わったあとに本当に楽しく、大学生活でもっとも充

実した時間を過ごせた、と感じたのだと思う。

BIOMOD ではスキルも身についた。ラボでの基本的な実験のやり方や、wiki をいじくりイラストレータを使いこなせる PC スキルなどが必要に迫られ身についた。だが、最も大きな収穫だと思ったのは、英語の重要性に気付けたことだ。

BIOMOD の本大会へ行って見て、海外のチームや日本の他のチームのプレゼンターの英語と比較して自分の英語の能力の低さを痛感させられた。BIOMOD はまさしく世界の社会の縮図であり、世界を舞台に戦うためには英語は必須だ。英語を道具として使いこなせるようになることを目標に、読み書きだけでなくコミュニケーションの面でも英語をもっと使えるようになりたい。

■ 松戸里紗さん (2012 Titech Nano-Jugglers)

「この夏、あなたは何をしましたか？」と聞かれたら、私は胸を張って「BIOMOD です。」と答えることができる。

2年生の4月、私は大学生活にどこか疑問を抱いていた。大学生といえば、自分の興味がある分野を自主的に勉強するというイメージがあったが、実際は目の前のことをこなすばかりであり、もっと自主的に勉強したい、と感じていた。だから、BIOMOD に対する先輩方の情熱に感化され BIOMOD に参加することにしたのだ。

アイデア出しをしていた時期は、毎日の様に図書館にこもって自分たちのアイデア実現に役立つ先行研究はないだろうか、と論文をこれでもかというほど漁った。いざアイデアが決まって実験を始めると、今度は実験がうまくいかない日々が続く、何が原因なのか、何時間もみんなで頭を悩ませた。BIOMOD 日本大会は、スライド

と原稿ができたのが当日の朝で、絶望感に浸りながらプレゼンをした。プレゼン中は緊張のあまり手が震えて、笑顔がとてもしこちなかったように思う。優勝できたときには本当に嬉しくて自然と涙がでた。

本番の日はあっという間に訪れた。会場であるハーバード大学は自然豊かでゆったりした広大なキャンパスであった。そのおかげで、BIOMOD 本大会では緊張せずにリラックスした状態で、チームのモットー『全員参加』を体現した、それぞれの役割をもったプレゼンをすることができた。

Wiki も YouTube も少しでもいいものを作ろう、と締切直前まで改正したことが功を奏したのだろうか、たくさんの賞をいただくことができた。本当に嬉しい限りである。受賞の夜に食べたロブスターは本当においしかった。

これらの結果と達成感はメンターの方々からのご指導や協力があつたからこそだと強く感じる。それと同時に、私を応援してくれた家族、友達にも感謝の気持ちでいっぱいである。そして、今まで一緒に頑張ってきたチームの仲間たち。よりよいものを作り上げるために、たくさん意見を出し合っ、衝突して、悩んで、笑って、とても楽しく充実した半年間を過ごすことができた。彼らにも感謝である。

ひとつの目標に向かって、チーム一丸となって全力でする努力はとても気持ちよく、一生、心に刻まれるであろう。BIOMOD に捧げるひと夏、得るものは必ずある。

■ メンターの視点から (2011-2013 年 東北大)

BIOMOD に打ち込んできた 30 名ほどの学生諸君を見て一番感じたことは、思わぬところに才能の種が転がっているということだ。完全に素人の状態から 3D 制作技術を身につけた学生、今では相当な技術で動画を作製する学生、分子運動のシミュレーションソフトを自作するに至った学生などの学生にも共通して言えるが、最初見たときはもちろん、数か月成長を見守った後も、そんな才

能がある人には見えなかった。おそらく、本人たちもそんな能力が身につくとは思っていなかったはずだ。そんな彼らが BIOMOD において必要に迫られて打ち込むことで、かなりのレベルにまで到達している。

BIOMOD 中は目覚ましい活躍を見せることができなくとも、参加後に覚醒した感がある学生もいる。たとえば英語力が TOEIC で 700 点近辺だったのに、2 年のうちに満点近くなり、さらにフランス語まで使い始めた学生、1 年で学術論文になるデータをしっかりと取り切った学生(これは 1 人ではない)、など。筆者は 5 つ以上の研究室を渡り歩いてきたが、こんな高確率で能力が目覚めたり覚醒したりするライトノベルのような学生集団に遭遇したことはなかった。

技術・能力・意識だけでなく、ひと夏をともに乗り越えた仲間もできる。BIOMOD はしんどい。プロジェクトが決まらない夏前、実験がうまくいかない夏、wiki や YouTube が仕上がらない秋、メンターにダメ出しされてへこむのは最初から最後まで。締切直前に訪れる時間との闘いやプレゼン前の抑圧感。時には足の遠のくメンバーにイライラを感じ、リーダーの無茶振りにチームが苦しむこともあるだろう。これらを乗り越え、かけがえのない仲間が組み上がる。

もちろん、ただ BIOMOD に参加すれば能力が身につくわけでも覚醒できるわけでも仲間ができるわけでもない。本気で勝負気で取り組み、寝食を削りながらあがき、その結果を心から受け止められるまで打ち込んで初めて得られるのだ。国内大会で惨敗し、失意のままに臨んだミーティングにおいて、普段のほほんとしていた学生が振り絞って出した「勝ちたい。だから今のままでは、ダメです」という言葉。BIOMOD を通して生まれる変化の源泉は、こうした決意の現場なのである。

参考文献

[1] <http://www.molecular-robotics.org/>

[2] 紙面の都合上、許可を得て改変している

藤原 慶 (慶應義塾大学)



PoLIce 東京大学（柏）2014年

第2章 プロジェクトを始める前に

12. テーマを選ぼう

プロジェクトのテーマを決めるのは意外と難しい。チームとしての意見をまとめなければならないし、まず何と言っても生体分子デザインに関する知識が足りない。ここではテーマを決めるために考えなければならないポイントを説明しておこう。

■ 何をしたいのか（価値観）

BIOMOD は、何か決められたゴールがあって、それを達成するタイプのコンペではないので、自分たちで目標を決めることができる。つまり、そのテーマが「生体分子デザイン」に関連していればなんでもよいわけである。こういったオープンエンディッドなプロジェクトでは、チームメンバーの価値観が重要である。どんなことに意義を見出すのかよく話し合っ、チームとしての価値観をつかんでおくことが大切である。

個人の価値観

- ・まだ誰もやってないことをやりたい。
- ・将来役に立つようなものを作りたい。
- ・とにかくオモシロイ！といってもらいたい。
- ・派手な演出をやってみたい。
- ・完成度の高いプロジェクトにしたい、等。

チームとしての価値観

- ・新規性、有用性、オモシロ性など、チームメイトが重要だと考えている要素について、何を最優先させるべきか、どの項目にどの程度の比重をかけるのか。

■ ブレインストーミング

チームの価値観をつかんだら、いよいよプロジェクトの内容について話し合うことになる。生体分子デザインに関連したプロジェクトならなんでもよいといっても、そもそもどんなことが生体分子デザインなのかかわからないだろう。しかし、それはそれとして、自分たちなりの生体分子デザインのイメージがあるはずである。この本を読んだり、過去のチームの YouTube を見たり、先輩や先生の話を読みきいてなんとなく持ったイメージでよいので、どんなことをやりたいのか、チームの仲間とアイ

デアを話し合おう。チームワークでアイデアをだす作業をブレインストーミングと呼ぶ。ブレインストーミングの方法(☞ 13)はたくさんあるので、いくつか試してみよう。

■ 煮詰まった時こそチャンス

ブレインストーミングをやっても、なかなかアイデアが出なかったり、堂々巡りになってしまったりして、行き詰るかもしれない。でもそういうときこそ、実はよいアイデアの出るチャンスなのである。何日もみんなで考えて、あれこれ検討したけれどもどれももうまくいきそうもない。もうアイデアは出尽くした。ぜひ、そう思えるまでブレインストーミングを続けてほしい。煮詰まり具合に比例して、諸君の頭の中にはアイデアを出すためのエネルギーが蓄えられているのである。その段階になったら、メンターの先生にアドバイスを求めよう。きっとよいヒントをくれるはずである。

■ よいアイデアにはしっかりした論理がある

では、どういうアイデアならよいのか。そのアイデアがよいかどうかの判断はどうすればよいのか。そのポイントは、論理 (Logic) があるかないかである。論理があるというのは、

1. チームの価値観が明確である。
2. その価値観に沿って問題設定がされている。
3. その問題を解くための方法がある程度明確である。

ということであり、しかも、この3つが単純な言葉で言い表されているということが大切である。要するにどういうアイデアなのかが一言でいえるようであればならない。

たとえば、

1. 普遍性のあるテーマをやりたい。

2. いろいろな場面で使えるツールを作る。
3. それは既存の研究を組み合わせたり、発展させたりすればできそうである。

といった感じにまとまるアイデアはよいアイデアかもしれない。ただし、特に3. については、学生だけでは判断が難しいかもしれない。ここでもメンターの先生のアドバイスを仰ごう。

■ テーマを具体化させる

論理のしっかりしたアイデアであれば、それをプロジェクトテーマとして具体化させることは比較的容易である。

- ・プロジェクト達成の要件（ゴール）は何か。
- ・それを実証する（実験する）方法があるか？
- ・材料は入手できるか？実験設備があるか？
- ・人手はあるか？時間はあるか？

といった、具体的な条件を検討してゆこう。

■ 評価システムをいつも念頭に

BIOMOD に出場する以上、勝つことを目指そう。BIOMOD で最終的にプロジェクトの優劣を決めるのは審査員だ。審査員は各チームのメンターとなる。メンターはこの分野の専門家たちだ。いくら自分たちが面白いと思っても、この人たちを納得させなければ高い評価は得られない。何が評価されるのか、BIOMOD の評価システム (☞ 3) をよく理解しておく必要がある。



他者に評価されるというのは、プロの研究者も同じである。研究費を受け取るには他人に評価し

てもらわなくてはならない。学問といえども、それが学問といえるかどうかは、研究者のコミュニティ=学会、ひいては人間社会が、それを価値あると認めるかどうかにかかっているのである。

■ プロジェクトは山あり谷あり

テーマを具体化させたら、もちろんそれを実行していく。本大会まで、時間はごく限られている (☞ 6)。しかし、最初に決めたテーマで最後までいけるかどうかはわからない。人数に余裕があれば、最初のうち複数のテーマを並行して走らせしばらく様子を見てから、上手くいきそうなテーマに絞り込むという方法もある。しかし、実験を進めるうちに、どうしても突破できない困難にぶち当たることがある。そんな時はテーマそのものを見直す必要があるかもしれない。その時、目先の目標だけを修正するのではだめで、テーマ全体の論理を最初から組み立てなおすということが重要である。なぜなら、審査員や聴衆は、最終的な発表だけをみるからである。テーマの再構築は、時に痛みの伴う作業であるが、やる価値がある。再構築の過程で、論理が研ぎ澄まされ、より明確になるからである。ここは頑張って乗り越えてほしい。乗り越えた先には、勝利が待っている！

コラム 著作権について

BIOMOD で作成する YouTube ビデオやプロジェクト Wiki はネット上で公開される。したがって、そこで使用する図版や映像、音楽などはオリジナルなものか、あるいは著作権フリーのものでなければならないことに注意しておこう。実際に参考にした論文などがあれば、きちんと引用先（著者、論文タイトル、雑誌名、年号）を表示して引用しよう。学術の世界では、他人の仕事に対するリスペクトは非常に大切である。

村田 智（東北大学）

13. ブレインストーミングの方法

「三人寄れば文殊の智慧」——集団でアイデアを出していく作業は、時として、1人で考えるよりもはるかに面白いものを短時間で生み出す効果をもたらす。プロジェクト立ち上げ時や、困難な問題を乗り越えるときには、集団で自由かつ発散的にアイデアを出していくことが重要になる[1]。この項ではブレインストーミングなど、集団でアイデアを出していくための手法について説明する。

■ ブレインストーミング

ブレインストーミングとは、発散的思考によって新たなアイデアや見方を見つける方法のひとつである。複数のメンバーで集まって、目的とするテーマに関するアイデアを自由かつ大量に出していくことで新しい視点や発想を見つけていく。創造技法として最もオーソドックスな手法である。

やりかたは単純明快である。まずテーマを決める。テーマは具体的なほうがよい（「工事現場の事故を減らすには？」というテーマよりも「ヘルメットを全員にかぶらせるには？」というテーマのほうがアイデアは出しやすい）。つづいて、そのテーマに関して、メンバーそれぞれが思いついたアイデアを説明しながら、大きな模造紙、あるいはホワイトボードに逐次書き出していく。人数、時間ともに制限はないが、目安となる人数は数人～10人程度、時間は1時間程度である。自由に発想することが重要なので、長時間続けたい場合でも1時間程度でリフレッシュのために休憩を入れるとよい。

ブレインストーミングは基本的に自由な発想の場であるが、以下の4点に留意する必要がある。

①自由奔放に考えてアイデアを出すべし
常識や良識にとらわれることなく、とにかく自由に考える。突拍子のないものであっても気にせずに出していくことが重要である。

②否定的な判断を下すことなかれ
発想したアイデアをすぐに評価してはいけない。自分が出したアイデアを自己否定することは言うまでもなく、他の人が出したアイデアに対しても、それがいかに無茶であろうとも、すでに結果が分

かっていることであっても、否定的な発言をすることは一切厳禁とする。

③質よりも量を重視すべし

少しでも良いアイデアを、などと見栄を張らず、とにかくできる限り多くのアイデアを出す。

④アイデアを結合して発展させる

既出アイデアの積極的な活用も重要である。一部を変化させる、異なるアイデアをつなげることで新しいアイデアを出す、などによって発展的な発想を行うことが有効である。上記②で述べたように、既出のアイデアを否定的に判断することは慎むべきであるが、否定的に見ることで、その改善法を考え、それによって新たな発想につなげることは有用である。

■ どうやってアイデアを出したらいいか？

アイデアの出し方は言うまでもなく「自由」である。しかし、「そうは言ってもどうしたものか…」と思考停止することもあるかもしれない。そこで発想法のヒントをいくつか記す。

①連想を活用する

連想として反対の連想、接近の連想、類似の連想などが挙げられる。

反対の連想の例：「昼⇔夜」「男⇔女」

接近の連想の例：「海⇔砂浜」「車⇔道路」

類似の連想の例：「ボール⇔地球」、「鳥⇔飛行機」

②発想を活用する

「強制連想」「類比発想」などの方法がある。強制連想とは「テーマに対して考えるべき方向を示し、それに基づいて発想する方法」、類比発想とは「テーマと本質的に似たものをヒントにする方法」である。

・強制連想の例：テーマが「新しいハサミ」だと
して、「変形したら?」「老人向けにしたら?」な
どの方向を決め、それを足掛かりにアイデアを出
す。

・類比発想の例：テーマが「新しいハサミ」だと
して、「ハサミの本質は“切る”」→「“切る”はギ
ロチンの本質でもある」→「ギロチンをヒントに
新しいハサミは?」という流れの思考を行う。

③視点を変えて考えてみる

「モノ」「性質」「機能」「組み合わせ」「鳥の目・
虫の目で」などを変えて考えてみることで新たな
アイデアにつなげる[2]。

■ブレインライティング

ブレインストーミングと似た方法のひとつにブレ
インライティング[3]がある。短時間で多くのアイ
デアを出せる、話すことが苦手な人たちが集まっ
てアイデアを出す必要があるときに有効、などの
特徴がある。6名のメンバーで行うことを例とし
て、その方法を簡単に述べる。

- 1) メンバーは円形、もしくは正形状に座る。
- 2) 6行3列のマスを書いたシートを6枚作成する。
- 3) 各自にシートを1枚ずつ配布し、テーマをシ
ートの上部に記入する。
- 4) テーマに関するアイデアを3つ考え、1行目の
3マスに記入する。制限時間は3~5分とする。
- 5) 時間になったら、自分のシートを左隣に渡すと
同時に右隣からシートを受け取る。
- 6) 受け取ったシートの1行目のアイデアを見て、
新たに考えた3つのことを2行目の3マスに記入
する。時間が来たら再び左隣にそのシートを渡し、
右隣から新たにシートを受け取る。
- 7) 受け取るたびに、そこに書かれているアイデア
を元に(前の人のアイデアを発展させてもよいし、
それをきっかけとして、さらなる独自案を考
えてもよい)アイデアを記入する。

これを6回繰り返して終了となる。このケースの
場合、必要な時間は最大30分、出てくるアイ
デアの数は最大で108個(=6人×3案×6ラウンド)

となる。

■マインドマップ

テーマから自由に連想されるアイデアを、絵を描
くような感覚で記入していく発想法である。

- 1) 用紙の真ん中にテーマを記入する。
- 2) テーマから思いつくアイデアをその周辺に記
入、テーマとそのアイデアを線で結ぶ。
- 3) 記入したアイデアから連想・発想されるアイ
デアをさらに記入していく。

アイデア同士を曲線で結ぶ、色鉛筆を使う、など
の工夫を施しながら楽しく作業することが望まし
い。ひとりでもできるアイデア創出法である。

■KJ法

上記3手法はいずれも発散的アイデア創出法であ
る。場合によっては整理作業を行う必要があるか
もしれない。最後にそのための手法としてKJ法
を紹介する[4]。KJ法の概略は以下の通りである。

- 1) カード(あるいはポストイット)にアイデアを
書く。1枚あたり1アイデアとする。
- 2) 似た内容のカードをまとめて、それを代表する
見出しをつける。
- 3) 見出し同士をまとめて、それを代表するよう
な見出しをつける。この作業を繰り返す。

この「まとめ」を行っていく過程で、発散的だっ
たアイデアの集合を整理することができる。

参考文献

- [1] 新編創造力事典, 日科技連出版社(2002)
- [2] 石井力重, アイデア・スイッチ, 日本実業出
版社(2009)
- [3] 高橋誠, ブレインライティング, 東洋経済新
報社(2007)
- [4] 川喜田二郎, 発想法, 中公新書(1967)

14. 設計するとはどういうことか

BIOMOD では生体分子の「デザイン」を競う。「デザイン」は日本語でいうと「設計」である。もっと平たくいえば、「デザイン」とはモノづくりの計画を立てることだ。基本は夏休みの工作と同じだが、相手が目に見えない分子だから、しっかりと手順を踏んでいく必要がある。

■ まず仕様を決めよう

テーマを選ぼう (☞ 12) で述べた様に、プロジェクトをつらぬく論理 (ロジック) が大切である。論理がしっかりしていれば、作りたいモノの持つべき機能や性質はおのずと明らかになってくるはずだ。そういった達成すべき性能を整理したものを仕様 (specification) と呼ぶ。設計のプロセスは、仕様を決めることからスタートする。

設計のむずかしさは仕様次第といってよい。仕様の中に矛盾する項目があると (例) 速度と燃費の両立する車、その仕様を満たすことができない (設計解がない) ということになってしまう。かといって、簡単に達成できてしまう仕様では、設計を練る必要もなく、つまらない作品しかできないだろう。

■ 設計のプロセス

設計のプロセスは、この図のようなものになる。1~6を何度も何度も繰り返す。つまり、設計とは試行錯誤そのものだ。繰り返し不具合を修正していくことでのみ、よい設計解にたどり着くことができる。

設計のプロセス

1. 仕様策定：実現したい機能を決める。
2. 部品選定：その機能に必要な部品を選定する。
3. 設計：部品を組み合わせたシステムを考える。
4. 実験：シミュレーションや実験を行う。
5. 評価：その結果を分析し、反省点を洗い出す。
6. 3 (または2または1) に戻ってやり直す。

各ステップでは、次のようなことに注意したい。

各ステップの注意点

1. 仕様策定：難易度の設定は適当か。
2. 部品選定：カタログ品等、すぐ手に入るか。
(☞ 73)
部品点数 (分子種数) が多すぎないか。

コストはどうか。(☞ 73)

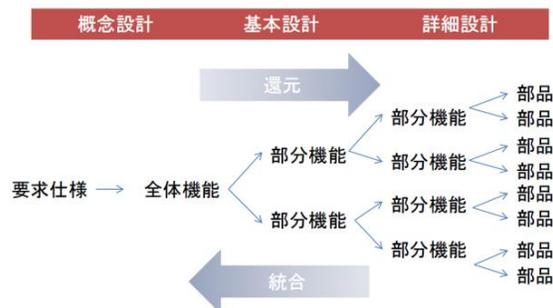
3. 設計：非現実的な仮定をしてないか。
都合のよい思い込みをしてないか。
4. 実験：シミュレーションモデルが作れるか。
(☞ 62)
現実的に実験可能か。(☞ 69,70)
5. 評価：再現性はあるか。精度はどうか。(☞ 70)

■ 設計の考え方

設計においては、初めは大まかに考え、次第に詳細に、具体的に検討していくのが王道である。

1. 概念設計
全体のイメージから必要な機能を割り出す
2. 基本設計
それぞれの機能を実現する構造や形状を決める
3. 詳細設計
部品レベルの寸法や材質を決める

細かく具体化していく作業を還元といい、その結果決まった部品を組み合わせていく作業を統合という。設計とは、還元と統合を行ったりきたりしながら、システムの細部を決めていく作業だ。このとき覚えておくとよいルールがある。それは、「機能と部品の対応関係を1対1にする」ということである。同じ部品を複数の機能のために使ってしまうと、修正や変更ができなくなってしまうからだ。そういった「最適化」は設計の枠組みが固まってからやるのがよい。



■ 工作のセンス ～悲観する力[1]

DNA 分子デザインは分子の工作である。工作といえ
ば、夏休みの宿題。誰しも何かの課題が与えられ、
空き箱とか割り箸で何かをつくった経験があると思
う。そのとき、思い描いた通りのモノができたろ
うか？ ほとんどの人は想像していたものとは似て
も似つかぬものがあったのではなからうか。

工作では、「うまくいかないことがふつう」である。
必ず予期しなかった悪いことが起こる。それに向き
合う「姿勢」が問われるのである。

工作のセンス

うまくいかないのがふつうと悲観する姿勢

↓

想像力：まだ作ってないモノを「見る」力

観察力：トラブルの原因を特定する力

臨機応変力：現場にあるものを利用する力

持続力：最適性を追求する力

想像力、つまり「見る力」とは、モノがどれだけ具
体的にイメージできるか、モノの形、大きさ、重さ、
質感、動作などをどれだけリアルに想像できるか
ということである。分子デザインの場合、分子の性質
や動きをイメージするためにはどうしても化学や分
子生物学の勉強が必要である。これは一朝一夕に身
につくものではないが興味の湧いた事柄から、教科
書を読んで地道に勉強しよう（☞ 第 4 章）。またい
ろいろな研究例も参考になるだろう（☞ 第 3 章）

観察力とは、どこがうまくいかないのかを見抜く力
である。実験結果をにらんで、トラブルの原因につ
いて仮説を立て、条件をいろいろかえ、根気よく調
べていく。そうして因果関係を突き詰めることがで
きれば、それが真の解決である。

臨機応変力とは、現場にあるものを使う力である。
日常目に触れるもので何か使えるモノはないか、コ
レはアレに使えるのではないかという発想力である。
ただし、なんでも流用すればよいというものではな
く、中途半端なあてはめはプロジェクトをゆがめて
しまうこともあるから注意しよう。

持続力とは、最適化を求める根気のことである。シ

ステムが完成してからも、どこかに不具合があるの
ではと心配し、やればやるほど完璧ではないと思う
ような人は、工作のセンスがあるといえるだろう。

以上のいろいろな力を総動員して、分子システム
をデザインしていくわけだが、そこに秘訣というよ
うなものはない。ただ一つ言えることは、「時間の余
裕を持って」ということだ。時間の余裕がなければ、
いろいろな観点から設計を見直すことなどできない
し、トラブルが出たときに対応することもできなく
なるからだ。スケジュール管理こそが、よい設計の
大前提なのである。（☞ 6,7）

- ・締切直前にラストスパートしても、技術の問題は
解決しないことが多い
- ・プロジェクト X 的苦労談に学ぶものはない！

コラム MIRACLE

設計を考えるときに、もうひとつ大事なことがある。
それは、MIRACLE はひとつに絞れ、ということだ
である。MIRACLE というのは、その機能を達成する
ために必要な未知の要素のことである。教科書や論
文に書いてない新規開発しなければならない要素だ
である。MIRACLE が一つもないプロジェクトとい
うのもありだが、単なる既存技術の組み合わせになっ
てしまいがちで、面白みに欠ける。逆に、MIRACLE
が複数含まれているプロジェクトは、約半年で結
果をださなければいけない BIOMOD では達成がき
わめて難しい。MIRACLE はひとつにして、それに
集中するのがよいプロジェクトだ。



参考文献

[1] 森 博嗣著、創るセンス 工作の思考、集英社
新書、2010 年

村田 智（東北大学）

15. 情報を手に入れよう

プロジェクトのテーマを決めるときや具体的に計画を進めていくとき、随時必要となってくるのが情報である。お勉強するにも情報，研究計画をたてるにも情報，実験するにも情報，何をするにも情報が必要。ここでは情報源の種類と，その入手方法について紹介する[1].

■ 書籍と論文

BIOMOD のプロジェクトを進めていくにあたって，いろいろと知りたいことが出てくるだろう。そもそも DNA って何なのか？ DNA を使って何ができるのか？ いいテーマを考えついたら，既にやられてはいないだろうか？ こんな感じの実験をするには具体的にどうすればよいだろう？ そういったことを調べるための情報源としては，主に書籍（教科書）と論文の二種類がある。書籍は基礎的知識を体系的に得るのに適している。一方で，論文は個別の研究内容について詳しく記述してある。また，書籍よりも速報性があるため最新の研究を知ることができる。実際にプロジェクトを進めていく中では，論文に接する機会が多くなるだろう。ただし，近年の例にもあるように，まれに不正確な情報が載っている論文もあるので，嘘は嘘であると見抜く能力を要求されることもある。

■ 論文の探し方

論文検索にはインターネットを活用することが多い。論文の検索サイトは種々あるが，どこからでも使えるサイトとしては Google Scholar[2]がある。たとえば「DNA origami (⇨ 18)」といったキーワードを検索窓に入力すれば，図のように検索結果が出てくる。ここでタイトルや要旨をざつ



くりと見て，読みたい論文を選ぶことができる。

論文探索にはいくつかのコツがある。適切な検索結果が得られないときは，検索キーワードを選ぶ際に以下のような項目を検討してみよう。

- 類語や別の表現でも検索し，検索もれを防ぐ
- 適度に具体的なキーワードを指定し，検索結果のノイズを減らす
- 検索演算子を利用して検索範囲を絞り込む

AND : スペースで区切る

DNA origami



OR : 「OR」もしくは「|」で区切る

DNA OR origami

DNA | origami



NOT : 単語の前に「-」をつける

DNA -origami



フレーズ : 「"」で囲む

"DNA origami"

※検索エンジンによって演算子が異なることがあります

興味深い論文を見つけたら，その論文の参考文献や被引用文献（その論文を引用している論文）をたどって関連論文を探すのもおすすめである。

■ 図書館の利用法

実際に書籍や論文を読むにはどうすればよいだろう。もちろん自分で購入しても良い。しかし，教科書というものは存外高いし，財源には限りがある。論文だって（実は）タダではない。やはり，せつかく大学に在籍しているのだから，図書館を有効活用すべきだろう。利用したことがある人は分かると思うが，大学図書館は専門書の種類も豊富だし，論文誌も大量に所蔵している。また，ほとんどの大学では図書館の HP から書籍名や著者名，論文の場合は雑誌名などで蔵書検索ができるようになってきているため，探している本が図書館に

あるかどうかとも予め確認できる。論文誌は禁帯出（持ち出し禁止）であることも多いが、お目当ての記事を館内で複写することが可能である。ただし、論文誌や書籍は著作物なので、複写する場合には「著作物の半分まで」に制限されていることに注意しよう [3]。読みたい論文誌が最寄りの図書館にない場合でも心配はいらない。他大学の蔵書であっても、文献複写サービスでお取り寄せできる。詳細な利用方法に関しては各大学の HP に書いてあるはずなので、そちらを参照されたい。

■ 電子ジャーナル

最近では、論文の電子ファイルがインターネット上で公開されており、図書館に行かずとも論文を読むことができる。論文はオープンアクセス（無償公開）のものも一部あるが、基本的には有料である。しかし、各大学で契約している論文誌であれば、大学内のネットワークからアクセスすると自由に閲覧・ダウンロードすることができるのである。ぜひとも最大限利用していただきたいと思う。ただし、「自由に」といっても、いくつか注意すべきことはある。何度も言うが、論文は著作物である。ゆえに、勝手な改編や再配布等は禁止されている。また、短時間に大量のダウンロードをすると、利用停止の恐れもあるので気をつけよう。

■ 論文を読む

BIOMOD を通じて初めて論文というものに接する人も多いだろう。日常生活で本や新聞記事などを読むときは、最初から順番に読み進めていくのが普通であると思う。しかし、論文の場合にはこのような読み方では少し効率が悪い。まずは論文の内容をさらっと確認して全体の流れをつかんでから精読すると、中身を理解しやすくなる。

論文は一般的には次のような項目で構成されている。論文によって順番や項目が異なることもあるが、どんな論文でもまず読むのはタイトルだ。タイトルには、その論文が何を主張しているのかが端的に表されている。たとえば、"Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns"[4]"とい

論文の構成例	
・ 題目	Title
・ 著者, 所属	Author(s)
・ 要旨	Abstract
・ 本文	
序論	Introduction
実験方法	Materials & Methods
実験結果	Results
考察	Discussion
結論	Conclusion
・ 引用文献	References

うタイトルを読めば、DNA を折り畳んでナノメートルスケールの形状を作る話なのだな、ということがすぐに分かるわけだ。次に要旨と図にじっくりと目を通し、論文の流れをつかむ。この際、序論の後半部分（その研究で何を目指し、何をしたかが書いてある）と結論も適宜参照すると理解の助けになる。そうして論文の全体像をつかんでから、一通り読んでみる。一度で全てを理解する必要はない。何度か繰り返し読みつつ、分からないところは教科書や引用文献を参照しながら理解を深めていくとよいだろう。BIOMOD の仲間や先輩たちと熱い議論を交わすのも一興である。

とはいえ、ここで紹介した読み方はあくまでも一例なので、結局のところ自分が読みやすいように読むのがよい。まずはどんどん論文を読んでみて、習うより慣れるのが一番である。

また、読んだ論文は文献管理ツールなどを用いて整理しておく、Wiki (☞ 8) で引用する際にも便利である。Mendeley, ReadCube, JabRef, … などの様々なツールがあるので、自分にあったものを使ってほしい。各々の詳細は Web で！

参考文献

- [1] 各大学の図書館 HP には資料の探し方に関するガイドが載っているので、そちらも一読してみるとよいだろう（たとえば http://tul.library.tohoku.ac.jp/modules/supp/index.php?cat_id=3 など）
- [2] <http://scholar.google.co.jp/>
- [3] 詳細な制限に関しては <http://www.ndl.go.jp/jp/service/copy/copyright.htm> を参照されたい
- [4] DNA オリガミの論文、実際に検索してみよう

高島英弥（東北大学）

16. 論文ってなんだ!

BIOMOD のトレーニングにテーマ決めに、論文読みは欠かせないと言われる。論文とは、研究の成果として公開される報告書である。論文が手元にとどくまでのプロセス、論文の中身、読み方などを概観する。

■ はじめに

現状、研究という人間活動は、調べて報告して評価されてまた調べて報告して...という科学的なサイクルで成り立っている。これを繰り返してちょっとずつ世界が豊かになってゆく、そんな様子を参加しながら眺めるのが研究者の生活である。ここでは、科学研究（もちろん人文科学も含む）できわめて重要な役割を占める論文について焦点を当てる。

■ 論文とは

科学雑誌に載る、あるテーマについて論じた報告書（図・動画含む）である。研究者（チーム）が直接調べたことを論じるため、一次情報と呼ばれる。多数の論文が述べてきたエッセンスを抽出して学びやすくまとめたものが教科書であり、これは二次情報と呼ばれる。有料無料さまざまに公開されているが、一次情報つまり論文へのアクセスが最もよい公的機関が大学であるため、大学では多彩かつ深い研究がしやすい。最新の Nature に自宅からアクセスしてみると、Letter で一報 3300 円かかる。査読付き論文と、査読なし論文がある。雑誌論文の他に、国際会議の抄録集(Proceedings)に記載される論文があり、国際会議論文と呼ばれる。分野により雑誌論文よりも査読が厳しく、高く評価される場合もある。

■ 科学雑誌とは

論文をまとめて出版する形式の冊子体。Magazine, Journal, Proceedings などと呼ばれる。1996 年以降、電子出版に軸足が大きく傾きつつある。一般誌といえば Nature, Science, PNAS など科学全般を扱うもの、専門誌といえば J.Am.Chem.Soc. や Biophysics J. など特定の分野を扱うものである。

■ 査読とは

論文は研究者である著者から科学雑誌に投稿されるが、そのまま掲載されることはない。投稿された論

文は、まず編集者 (Editor) が目を通し、良さげであれば査読者 (Referees) へと送られる。通常、専門分野の複数名の査読者が、論文を精読して編集者へコメントを返す。その結果、編集者が掲載を決めるが、ほとんどの場合、コメントは著者へ返ってきて、コメントにしたがって論文を修正する。これを繰り返し、編集者が認めれば論文は受理 (Accepted) となる。不受理 (Reject) になることも珍しくない。専門の科学者による最初のチェック機構が査読システムである。ちなみに編集者の段階で Reject される通称 Editor Kick は、とても、つらい。

■ 論文の種類

雑誌によって表現はさまざまだが、原著論文 (Original paper) では 2 ページ程度の Communication, 4 ページ程度の Letter, 5 ページ以上の Full paper などがある。Full paper は論文の華。ほかに、ある分野の関連する論文をまとめて引用し、分野の最新の動向を概観し、到達点、問題点を整理した Review がある。Review だけ読めばよいような気もするが著者も人間、紹介する論文に偏りがでる。公明正大な Review は膨大な参考文献を示してくれ、全体像の把握に骨が折れたりもする。

■ 論文の中身

代表的な Full paper の構成を例に紹介しよう。

Title : 重要. これを読まないと話にならない。苦心の跡が見受けられたりして楽しいこともある。

Author(s): 著者。最初に名前のある著者 (筆頭著者) が論文を書いた人。Corresponding author[*]が論文の全責任者である。あいつか、とか新人か!とか。

Affiliation: 著者所属。うわデンマーク気合い入ってんなあ、とか、あいつ移籍したの?とか。

Abstract : アブスト. 概要. 超重要. ここまで読んで探していた内容と違うなら他の論文を当たるべし。

Introduction: この論文の研究に至るまでの流れが記述されている。熟知している場合飛ばしてよい。

Materials & Methods: 重要。 論文の主張を支持するために行われた実験手法の詳細が記述されている。

Figure(s): 超重要。 データが記載されている。

Result, 実験の結果が記載されている。慣れていれば読まなくても **Figure** だけでわかることも多い。

Discussion: 重要。 結果からの考察が展開される。英語ネイティブの論文でここが長いことが多い。あちこちから自分の主張に有利な論文を引っ張り出してきてだらだら長く展開しているものは、いいすぎ、オーバーディスカッションとしてイヤがられる。

Conclusion: ここがトリッキーなことはまずない。

Acknowledgement: 謝辞。論文作成への議論や技術補佐、サンプル提供、研究資金提供への感謝。

Reference: 参考文献, 超重要。 ここに論文を記載することを引用, という。引用された論文は、議論に値する研究として読まれ、選ばれたわけであるから、論文の受理数より被引用数は重要である、とも言える。参考文献からその参考文献へ...と時代を遡ってゆくと、過去になされた偉大なオリジナルの発見にたどりつけるようになっていく。金鉱掘りや有名人を訪ねてゆくようで面白い。

Supplementary Information: 重要。 実験が複雑になってきた昨今、詳細な手順や微妙な条件は本文中には記述しきれないことも多い。それを補うための資料である。電子出版時代になりストレージ価格破壊と共に脚光を浴びており、そろそろ容量制限をかけて欲しい気もする。DNA オリガミの配列などはここに記されることがほとんどである。動画もほとんどはここに置かれている。エッセイ風に苦労話を書いてあるものもあり面白い。

■ 論文を読もう

気になるテーマで論文を探そう (☞ 15)。先輩や先生に聞くのがおすすめだ。まず、素直にぜんぶ読む。次に、批判的にねちねち読む。特に実験系の論文では、記載された実験によってほんとうに著者の主張が十分に支持されているのか、ということが焦点に

なる。ツッコミの精神はここでも重要だ。怪しい所引用があった場合、その論文を探して読もう。どこまでホンマやねん、という探究心は重要だ。大きいことを言っていてツッコミどころが極小な論文は、仕方がない、よい論文である。よい論文に放置されたボケは、新しいテーマになる。

■ 論文の価値

論文が書けると嬉しい。雑誌に載ると嬉しい。引用されるとまた嬉しい。論文の数が多いと、それだけ研究テーマを数多く発表したことになるので、研究者の活性の指標にはなる。では論文の価値はなんだろう。本項冒頭からひきつぐと、世界を豊かにするためにどれだけ貢献する論文か?ということになる。そのためには、オリジナリティが高いか?再現性の高い研究か?どれだけ応用範囲が広いか?などなどが重要となってくる。被引用数はその指標のひとつで、他に雑誌ごとに発表される影響度、ImpactFactorなど様々な指標がある。もちろん、特定のテーマを追跡してゆくのが研究達成への近道なのであるが、研究も論文発表も人間のやることなので、気に入った論文、気に入った著者が見つかったなら、それを追いかけていくのもまた、楽しい。責任著者は e-mail アドレスを公開している。面白かったり、疑問点があったら思い切ってメールしてみるのもいいだろう。きっと喜ばれる。

■ 論文を書こう! [1]

概観してきたように、論文は結果であり議論の場であり次世代への踏み台でもある。読んだなら何かしら感じる場所があるはずだ。論文の土俵は老若男女を問わない。伝えたい主張したい材料がたくさん集まってきたのなら、BIOMODの成果も、論文になるべきだ。遠慮せずに、さあ書こう。

参考文献

[*] 責任著者マーク。大概の雑誌に共通している。後輩の名前にこれがついていると破壊力抜群。

[1] 成書は山ほどある。が、木下は雄「理科系の作文技術」を読んで足りなければ他を探そうか。

野村 M. 慎一郎 (東北大学)



Team Hokudai 北海道大学 2014 年

第 3 章

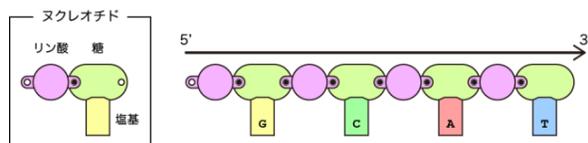
DNA 分子デザインでこんなことができる！

17. 概論 構造 DNA ナノテクノロジーとは

DNA 分子を材料にさまざまなかたちを作り出すのが、構造 DNA ナノテクノロジーと呼ばれる技術である。ここでは、そもそも DNA とはどのような分子なのか、これを使うことでどのような基本的な構造の要素を作ることができるのか、そして、現在広く用いられている構造作成の3つのアプローチについて概観する。

■ DNA 分子とは

そもそも、DNA って何？と聞くと、おそらくほとんどの方は「遺伝子！」と答えるのではないだろうか。もちろん、生物の時間だったらそれで正解。でも、いままでこの DNA を、かたちのある「分子」として捉えたことはあるだろうか？化学的にみても、DNA は糖・塩基・リン酸が、ヌクレオチドとよばれるひとまとまりの単位となって、さらにそれが長く数珠状に連なった（ポリマーといいます）分子にほかならない。このかたちの DNA をとくに「一本鎖 DNA」とよぶことがある。



塩基には4種類あり、人間はこれにA(アデニン)、G(グアニン)、C(シトシン)、T(チミン)、と名前をつけている。一本の DNA にくっついている塩基を、端から順番に読んでいったものを**塩基配列**という。DNA には向きがあり、端が(糖からリン酸につながる結合の位置関係に応じて)5'末端と3'末端とに区別されていて、配列は5'末端から読んでいく。(図のように、矢印でその向きを示すことが多い。)

じつは先の「DNA は遺伝子」というのは、生き物がこの塩基配列を**情報**として読み取り、これを解釈してタンパク質を作ったり、さまざまな調節を行っているからなのである。DNA そのものは分子でしかなく、生き物はそこに自分たちにとって意味のある情報を記し、読み出すための「記録媒体」として利用している、というわけだ。

さて、この DNA がつくる有名な構造に、**二重らせん**

せんというものがあることは皆さんも御存知だろう。逆向きになった2本の一本鎖 DNA がくっつくことでこのような形となるわけだが、ここにも塩基が大切な役割を果たしている。じつは塩基同士には、**相補性**とよばれる性質がある。塩基間の水素結合を利用することで、AにはTのみが、CにはGのみが特異的なペアとなってくっつくことができる。相補的な配列を持つ2本の一本鎖 DNA が、塩基同士の水素結合でもってお互いに結ばれる(ハイブリダイゼーション)ことで、この二本鎖の二重らせん構造をつくるのが知られている。(細かく言えば、上下の塩基間の疎水性相互作用も二重らせん構造の形成に重要な役割を果たしているのだが、ここでは割愛する。)これを工学的視点で捉えると、さまざまな配列をもった DNA をつくり水中で混ぜたとしても、相補的な配列をもつ DNA 同士のみがお互にくっついて二本鎖 DNA、すなわち二重らせん構造を**自発的**にとるとみることができる。この辺りについては、トピック 41-44 により詳細な説明があるので、是非読むようにしよう。

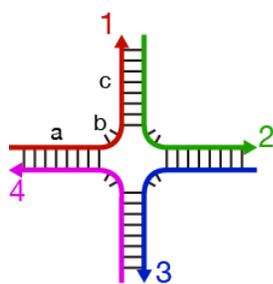
■ DNA ナノ構造の要素

このように DNA を「分子」という側面からみると、ひも状の分子が、内部の塩基配列によってはお互にくっついて、ひとりでに二重らせんをつくるという、なかなかおもしろい性質をもった材料だと捉えることができるだろう。じつはトピック 45 で紹介するように、現在では、任意の配列を持った DNA 分子を化学合成することができる。任意の配列をもつ DNA を自在につくることできるということは、ある相補配列をなるべくほかの場所の相補配列と被らないように設計する(**正規直交配列**という)

ことで、二重らせんを作る箇所を一意に指定できる、というわけだ。

このような考え方をもとに、まず考えられたのが DNA の分岐構造、そして粘着末端である。じつはこれら2つは、この後に紹介する、より複雑な DNA ナノ構造をつくるうえでの、重要な構成要素となっている。

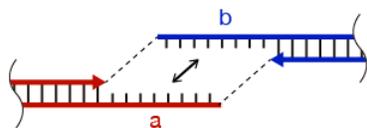
<分岐構造>



たとえば左図に示すように、1番の DNA の領域 (a) は4番の DNA と、(c) は2番の DNA の特定の領域と相補的な配列を持つように設計する。相補的な配列をもつところだけが

ハイブリダイゼーションして二重らせんを組むわけだから、このような DNA を4種類設計すれば、この四つ又分岐構造が出来上がる、というわけだ。ひとつの DNA をいくつかの領域に分け、それぞれがどの異なる DNA のどの領域とつくかというのを指定することにより、二重らせんがただ真っ直ぐに伸びるだけでなく、二次元に広がった、より複雑な構造を作ることが可能になる。現在 DNA ナノ構造の構成要素としてよく用いられているのは、ここで紹介した四つ又分岐 (b の一本鎖領域がないものを、とくにクロスオーバージャンクションということがある)、そして同様の方法で作られた三つ又分岐である。

<粘着末端>



DNA ナノ構造を考えるうえで、もうひとつ大切な構成要素がこの粘着末端である。

二本鎖 DNA の端に一本鎖 DNA の領域を設けたものをつくる。このとき、a の塩基配列と b の塩基配列が相補であれば、赤・青二種類の二重らせんはこの a/b のハイブリダイゼーションを介して一つにつながる。この a,b といった一本鎖領域を粘着末端 (sticky end)

とよぶ。選択的にくっつく「糊」のような機能を持つ端部として、ユニット同士をつないで大きな構造を作る際に多用されるテクニックである。

■ 3つのアプローチ

では、そんな分岐や粘着末端といった要素を使って、どのようにしたら構造を作ることができるだろうか？現在のところ、DNA を使ってかたちを作るアプローチは、主に3つに大別されている：

- 1 折りたたむ - DNA タイル・オリガミ
- 2 ネットワークをつくる - DNA ハイドロゲル
- 3 コネクタとしてつかう - SNA

それぞれのアプローチは、DNA という分子をどのように捉えているかでもって整理できる。折りたたみの手法の場合は、DNA の二重らせんを束のようにまとめあげていくことで様々なナノ構造をつくる。そのため、二重らせんをひとつの「筒」とみても、その筒同士をつなげるように構造設計を行っていく、というのがおおまかな方針となる。代表的な例としては、DNA オリガミや、さまざまな DNA モチーフを利用した DNA タイル、そして最近発表された DNA ブリックといった手法などが挙げられる。DNA ハイドロゲルは比較的あたらしい構造作成手法で、DNA を堅い筒とみるというよりも、DNA 同士がつながっていったときに現れる長い二重らせんを「柔軟な高分子構造」とみなすことで、それを組み合わせてネットワークを構成し、マクロスケールのゲルを作るという発想だ。(21)で紹介する3つ目の SNA は、DNA 自体の構造そのものに着目するというよりも、どちらかといえば DNA のもつ選択的結合性に着目し、これを「長さのある選択的に働く糊」のように扱う。金ナノ粒子にこれらの DNA をつけることで、ナノ粒子同士の相互作用を制御して結晶をつくる、というのが主な方向性となる。

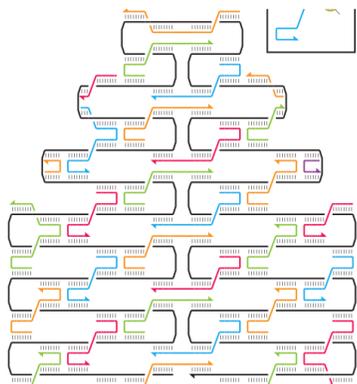
それでは、次章からは、個々の手法について具体的に学んでいくことにしよう。

18. 2次元 DNA オリガミ

BIOMOD のプロジェクトで最も多く目にするだろう「DNA オリガミ」という DNA ナノテクノロジーにおける一大研究領域は、2006 年に *Nature* 誌に掲載されたスマイリーマークから始まった。その精緻な構造の数々の根底に流れる設計原理を概説する。

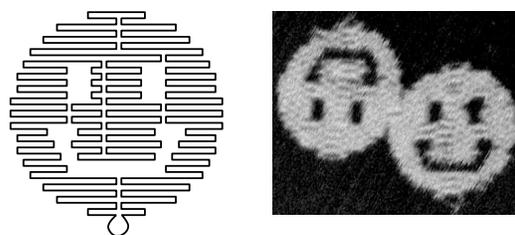
■ DNA オリガミの基本構造

DNA オリガミ構造体を構成する要素はたったの二種類、スキャフォールド (scaffold) 鎖と呼ばれる長鎖の一本鎖 DNA と、ステープル (staple) 鎖と呼ばれる多数の短鎖の一本鎖 DNA だ。スキャフォールド鎖はその名の通り、構造形成の足場となる鎖で、通常は 7249 塩基の環状一本鎖 DNA である M13mp18 ssDNA が使用される。これは M13 という大腸菌に寄生するファージウィルスのゲノムで、生物由来のために非常に均一なもの入手できる。このファージウィルスを使うと、任意の DNA を一本鎖に調製できるため、現行の DNA シークエンサーが開発される以前は、DNA の配列解析に使うツールとして広く使用されていた。このため、今日でもリーズナブルな価格で、バイオ系の試薬会社から購入できるのだ。M13mp18 ssDNA は、通常、環状のまま使用する。酵素で切断して直鎖状にして使うこともできるが、切断が定量的に進まない場合、オリガミ構造体の形成も不完全になってしまうため、あまり推奨されない。同様に、より大きな DNA オリガ



DNA オリガミの概念図。一筆書き状に折りたたまれた黒い線がスキャフォールド鎖、色の付いた線がステープル鎖。この図の場合は、ステープル鎖は Z 字型に配置されている。
Reprinted with permission from *Nature*, 2006.

ミ構造体を作成するために、M13mp18 ssDNA 以外のスキャフォールド鎖 (例えば入フェージゲノムの断片) を使う試みも報告されているが、やはりできあがりの均一性は、M13mp18 ssDNA にはかないようだ。



スマイリーDNA オリガミの設計図と AFM 像
Reprinted with permission from *Nature*, 2006.

このスキャフォールド鎖を織物の横糸のように一筆書き状に折りたたんで、狙い通りの平面構造に固定する役割を果たすのがステープル鎖だ。「ホッチキスの針」の名を持つこのステープル鎖は、通常 32 塩基の長さをもつ。DNA オリガミ構造体を形成させるためには、DX タイル同様、DNA 二重らせんをいかにだ状に束ねていく必要がある。これを実現するためには、1 番目のらせんと 2 番目のらせんを結合するクロスオーバーから数えて、らせんを 1.5 周進んだ位置に次の 2 番目のらせんと 3 番目のらせんをつなぐクロスオーバーを配置していけば良い。B 型 DNA 二重らせんの周期は 10.5 塩基対なので、これは $10.5 \times 1.5 = 15.75$ 塩基に相当する。しかしながら、小数点以下の塩基数は扱いにくいので、16 塩基に近似してしまうのが一般的だ。すなわち、DNA オリガミ構造体内では、16 塩基ごとにステープル鎖がらせんを乗り越えていくことになる。32 塩基中の 16 塩基は、この「2 番目のらせんと相補的な部分」に由来するが、ステープル鎖はさらに 1 番目と 3 番目のらせん

とも結合しなければならない。そこで、1番目のらせんと相補的な8塩基と3番目のらせんと相補的な8塩基がさきほどの16塩基に追加されて、合計32塩基になるわけだ。このようなわけで、DNAオリガミの設計図の中では、ステープル鎖はS字やZ字型に折れ曲がって、スキヤフォールド鎖と結合することになる。どちらでも同じに見えるかもしれないが、らせんには巻きの向きが関係してくるため、ステープル鎖をS字型で設定するかZ字型で設定するかで大きな違いが生じるので注意が必要だ。すなわち、ステープル鎖をS字型に配置した場合には、ステープル鎖の末端はいずれも設計図の裏側に向かって一番奥に配置されるのに対し、Z字型に配置した場合には、いずれも設計図の表側にくることになる。ステープル鎖にさらにDNA鎖等をぶら下げる必要があるときにはよく注意しよう。さて、32塩基のステープル鎖で7249塩基のスキヤフォールド鎖を折りたたむには、単純計算でも $7249 / 32 = 226.5$ 本のステープル鎖が必要になる。M13mp18ゲノムの配列は基本的にはランダムであると見なせるので、全て異なる配列の二百数十本のDNA鎖が必要になるわけだ。これらを混ぜるだけでも大変だが、美しい構造体が観察できることを想像してがんばろう。

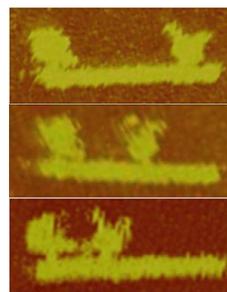
■ DNAオリガミの作成と観察

正しく設計ができていて、ステープル鎖全てが手に入れば、DNAオリガミ構造体の作成はとても簡単だ。DNAナノテクノロジーで一般的に使われている1×TAE/Mg²⁺緩衝液（40 mM Tris, 20 mM 酢酸, 2 mM EDTA, 12.5 mM Mg²⁺が含まれている）にスキヤフォールド鎖と過剰のステープル鎖（通常5等量程度）を溶かして、90℃から25℃までゆっくり冷ます（これをアニーリングという）だけで、ステープル鎖は自身と相補的なスキヤフォールド鎖の所定の位置を見つけ、望み通りの形状にスキヤフォールド鎖を折りたたむ。ここで肝心なのは、溶液中に必ず二価の陽イオン（通常はMg²⁺）を加えることだ。DNA鎖は、リン酸ジエステル結合せいで大量の負電荷を

帯びており、そのままでは静電反発でDNAオリガミのようならせんが密集した構造は取りえない。これを中和してらせん同士を橋かけしてくれるのが、二価の陽イオンというわけだ。

この二価の陽イオンは、DNAオリガミの観察にも欠かせない。薄い平面構造をもつ二次元のDNAオリガミ構造体は、原子間力顕微鏡（AFM）で観察するのが一般的だ。極めて平坦な構造をしている劈開直後のマイカ（雲母）に上記のDNAオリガミ溶液を滴下すると、マイカ表面の負電荷とDNAオリガミの負電荷を二価の陽イオンが橋かけしながら中和し、結果としてDNAオリガミがマイカの表面にきれいに貼り付いてくれる。この結合は、AFMの探針が叩いても容易にDNAオリガミがはがれないくらい強固だ。全てがうまくいっていればこのようにして、DNA二重らせんの太さである2 nmの厚みを持った、狙い通りのオリガミ構造体が観察できるはずだ。

コラム DNAオリガミでつくったパラパラマンガ



BIOMOD2013では、関西大学によるTeam Kansaiが、全部で10枚のAFM画像からなる「うさぎとかめ」の「DNAオリガミパラパラマンガ」を発表し、金賞を受賞した。土台とかめ、うさぎをリンカーで結んでステープルの数を極力減らした工夫が評価された。チームはさらに、街路樹が流れていく背景のレイヤーもDNAオリガミで作成し、文科省主催の「サイエンスインカレ」でファイナリストにも進出した。

参考文献

- [1] Rothmund, P. W. K. *Nature* **2006**, *440*, 297-302.
- [2] Kuzuya, A.; Komiyama, M. *Nanoscale* **2010**, *2*, 310-322.

葛谷明紀（関西大学）

19. 3次元 DNA オリガミ

日本人にとってなじみのある「折り紙」といえば、「かぶと」や「やっこさん」などの平面 (= 2次元構造) だけでなく、やはり「鶴」などの立体 (= 3次元構造) も欠かせないだろう。ナノスケールの DNA オリガミでももちろん、3次元構造体の構築法がいくつか考案されている。

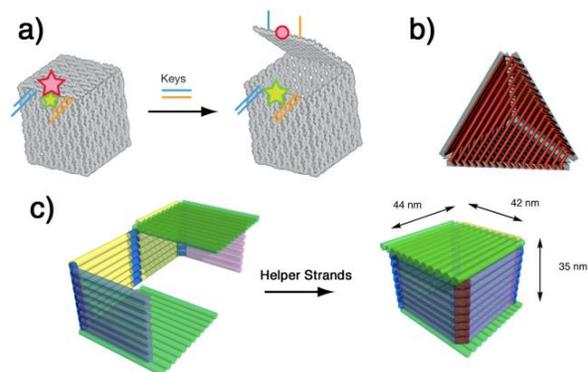
これまでに報告されている3次元 DNA オリガミは、大きく分けて二つに分類することができる。

■ 中空の3次元 DNA オリガミ

3次元 DNA オリガミ構造体として最も初期に作られたのは平面を組み立ててできる中空の多面体 DNA オリガミ構造体で、2009年にほぼ同時に4種類の構造体が発表された。[1-4] そのうちの2つは箱型 DNA オリガミ構造体で、これらの構造体はどちらも、箱型構造体をナノコンテナとして応用することを志向して、「箱の開け閉め」を人為的に制御できる仕組みが施されている(残りの構造体は、それぞれ正四面体と、プリズム型である)。Anderson らの構造体は、おおよそ 40 nm 角の立方体の一面だけが箱の蓋のように開閉できるよう、各面どうしの結合が工夫されている。[1] 蓋の固定は、2対の部分的に相補な DNA 鎖で行っており、これと完全相補な DNA を加えることで、選択的に蓋を開くことができる。筆者らは、蓋を固定する DNA 鎖のペアを「錠前」、蓋を開けるための DNA 鎖を「鍵」と呼んでいる。Anderson らは後に、同じメカニズムで動作する、より小さな箱型構造体も作成している。[5]

我々が別個に製作した最初期の「ナノメカニカル DNA オリガミデバイス」も、おおよそ 40 nm 角の正方形 6面からなる箱型 DNA オリガミ構造体であるが、その動作メカニズムは上記の例とは少々異なる。[2] この構造体は、当初は互いに直交する3つの面からなるユニットが2つ、ヒンジ部でつながった「開いた構造体」に組み上がる。ここへさらにトリガーとなる DNA 鎖を加えることで、箱型の「閉じた構造体」へと変型する。最近では内部に直径 10 nm の金ナノ粒子を選択的に一粒子だけ取り込み、ナノキャリアへと応用することにも成功している。[6] また、

開閉する箱型 DNA オリガミ構造体への金ナノ粒子の選択的な取り込みは、Sugiyama らによっても報告されている。[7] こちらの系では、DNA オリガミ構造体の固定に光反応性の特殊塩基を使うことにより、光刺激をトリガーとした構造変化を実現している。

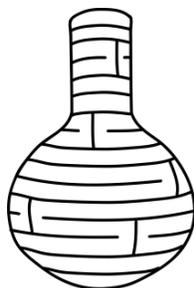


様々な中空3次元 DNA オリガミ構造体. (a) Anderson らの箱型 DNA オリガミ構造体. [1] Reprinted with permission from *Nature*, 2009. (b) 正四面体 DNA オリガミ構造体. [3] Reprinted with permission from *Nano Lett.*, 2009. (c) 我々の箱型 DNA オリガミ構造体. [2]

前記の箱型構造体はいずれも、開状態ではオリガミ構造体を固定する部分を有しない。そのため、これらの構造体が開くための駆動力は、水溶液中における自由運動によるものである。積極的な駆動力をもって DNA オリガミ構造体を構造変化させた例としては、Firrao らの研究例が挙げられる。彼らはチューブ状の DNA オリガミ構造体に DNA の二本鎖形成によって駆動される同様のハッチを設け、その開閉動作を確認している。

中空の3次元 DNA オリガミ構造体には、DNA オリガミ中で DNA を曲げる技術を利用して、曲面も

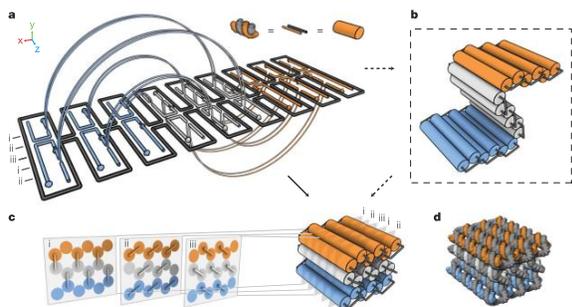
利用することができる。[8] Yan らはこれにより、壺型の構造体や、球体 DNA オリガミの構築に成功している。



[8]を参考に図を作成。

■ ハニカム 3次元 DNA オリガミ

3次元 DNA オリガミ構造体のもう一つのカテゴリーが、ハニカム 3次元 DNA オリガミだ。[9]



Reprinted with permission from *Nature*, 2009.

caDNAno を使う BIOMOD 参加者にとっては、こちらの方がなじみがあるだろう。中空の DNA オリガミ構造体の場合、DNA そのものは非常に柔らかいため、水溶液中での実際の構造には、かなりのゆらぎがあると推定されている。一方で、平面状のオリガミをひだ状に折り重ね、中身がつまった立体構造を形成するハニカム 3次元 DNA オリガミでは、このような問題を考えなくて良い。この方法を用いると、構成する DNA の長さをうまく調節しながら異なる面積の平面を重ねることで、形成される立体構造には曲がりやねじれまで導入することまでできる。[10] 今日ではこのような曲がった構造体を複数組み合わせ

せて、鳥かご状の巨大構造など、従来考えられなかったような複雑な立体ナノ構造体が自在に構築できるようになっている。最近では、リポソームに穴を開けるイオンチャンネルの機能を持つ構造体なども作られている。[11]

参考文献

- [1] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H., Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature*, **2010**, 459, 73.
- [2] A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **2009**, 4182.
- [3] Y. Ke, J. Sharma, M. Liu, K. Jahn, Y. Liu and H. Yan, *Nano Lett*, **2009**, 9, 2445–2447.
- [4] M. Endo, K. Hidaka, T. Kato, K. Namba and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 15570–15571.
- [5] R. M. Zadegan, M. D. E. Jepsen, K. E. Thomsen, A. H. Okholm, D. H. Schaffert, E. S. Andersen, V. Birkedal, J. Kjems, *ACS Nano* **2012**, 6, 10050.
- [6] A. Kuzuya, M. Kaino, M. Hashizume, K. Matsumoto, T. Uehara, Y. Matsuo, H. Mitomo, K. Niikura, K. Ijiro, Y. Ohya, *Polym. J.*, **2015**, 47, 177-182.
- [7] T. Takenaka, M. Endo, Y. Suzuki, Y. Yang, T. Emura, K. Hidaka, T. Kato, T. Miyata, K. Namba, H. Sugiyama, *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 14951.
- [8] D. Han, S. Pal, J. Nangreave, Z. Deng, Y. Liu and H. Yan, *Science*, **2011**, 332, 342–346.
- [9] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature*, **2009**, 459, 414
- [10] H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Science*, **2009**, 325, 725.
- [11] M. Langecker, V. Arnaut, T. G. Martin, J. List, S. Renner, M. Mayer, H. Dietz and F. C. Simmel, *Science*, **2012**, 338, 932–936.

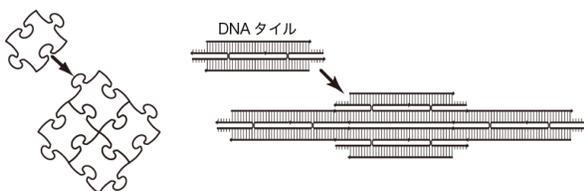
葛谷明紀 (関西大学)

20. DNA タイル

DNA ナノ構造の作製手法の中でも、パターンをもつ二次元構造や三次元結晶を作る際に用いられるのが、この DNA タイルと呼ばれる方法である。ここではその基礎について、二次元の DNA モチーフを例に紹介する。また、アルゴリズムック・セルフアセンブリとよばれる手法の基本的な考え方について概説する。

■ DNA タイル = モチーフ + 粘着末端

DNA を折りたたんでつくるナノ構造の代表的な作成手法のひとつが、DNA タイルである。たとえるならば、ピースを次々にくりかえしてつけていくジグソーパズルを、分子のスケールで実現したようなものだと思うと分かりやすい。



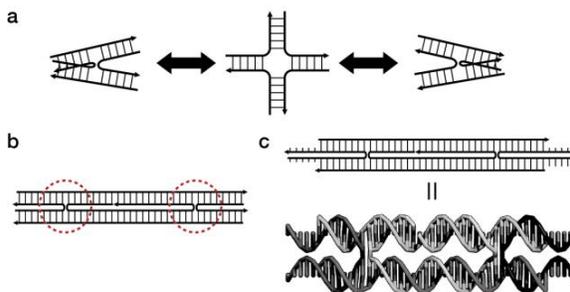
[1]より許可・改変の上転載

ジグソーパズルでいうところのピースに相当するのが、複数の DNA 二重らせんがくみ合わさった、モチーフとよばれる構造ユニットである。また、パズルの場合は、いろいろな種類の凸凹が端にあって、このかたちでもってどのピース同士がつくかというのを決めているわけだが、DNA タイルの場合は**粘着末端**がこの役割を果たす。粘着末端が相補配列となった DNA タイル同士のみが、互にくっつくことができるわけである。ジグソーパズルの場合は、もちろん人間がひとつずつピースを組みあげていくわけだが、DNA タイルの場合は、溶液中のブラウン運動とハイブリダイゼーションを利用することで、ひとりで構造がくみあがる。これを**自己集合**という。具体的には、**アニーリング** (☞76) とよばれる除冷方法を利用することで、熱力学的に安定な状態、この場合端的にいうと「二重らせんがよりながく構成される状態」にもっていくことができる。この手法を利用することで、冷却の過程で、溶液のなかにある複数種類の DNA 分子はまずタイルを形成し、さらにそのタイル同士が自己集合し、二次元や三次元

の構造をつくる、というのがおおまかな構造形成の流れとなる。(つまり、DNA の場合は、パズルのピースそのものも溶液の中でひとりで出来上がるわけである。)ここでは、その DNA タイルの基礎となるさまざまなモチーフと、アルゴリズムック・セルフアセンブリとよばれる DNA タイルを利用したパターン形成について概説する。

■ DNA モチーフ

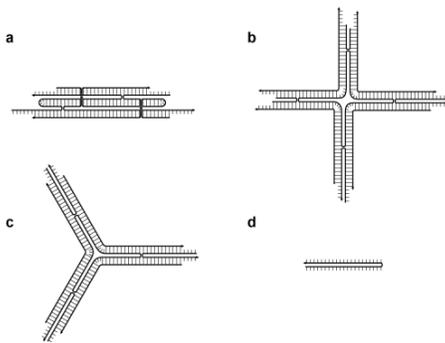
DNA の分岐構造を組み合わせることによってつくられる「繰り返し単位」となる構造のことを DNA モチーフと呼ぶ。DNA タイルに用いられるモチーフの中でも、もっとも代表的なものが、**ダブルクロスオーバー** (DX) 分子と呼ばれる構造である。マグネシウムイオンなどで DNA 同士がもつ静電的な反発をおさえるように調製した水溶液中では、四つ又分岐(クロスオーバー)構造は、下図 a の左右のように閉じたコンフォメーションをとることが可能になる。ただもちろん、この状態では分岐部分がヒンジのように自由に動いてしまうため、かたちを一意に定めることは出来ない。そこで b のように分岐を2つ並べることによって、二本の二重らせんを並行にならべたかたちで固定したのが、このダブルクロスオーバー分子である。



[1]より許可・改変の上転載

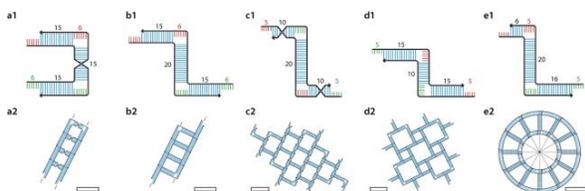
ダブルクロスオーバー(DX)タイルは、タイル間の二重らせんの位相に矛盾が出ないように長さを調整したうえで、cのように粘着末端部をつけたものである[2]。粘着末端同士が接続されることで、二次元状にタイルが連なった平面構造を作製することができる。このときの構造の外観は、二重らせんが並行に並んだ束のようになる。

類似の手法で設計することで、二重らせんを三本束にして並べたモチーフ形状を持つトリプルクロスオーバー(TX)タイル(a)[3]、回転対称性を持つ n-point star (b)[4]、四つ又分岐状に並べたクロス・タイル(c)[5]、最終的な構造を取るときにはじめて二重らせんをくむ、一本鎖のみでタイルが構成されたシングルストランド・タイル(SST) (d)[6]なども知られている。



[1]より許可の上転載

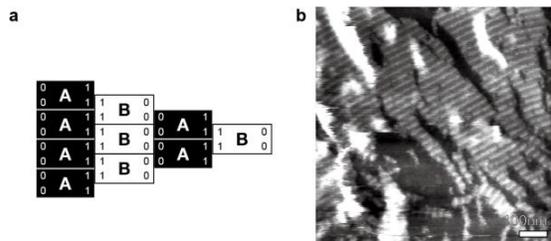
著者らが開発した T-モチーフ[7]は、T字型分岐という、クロスオーバー分岐とは異なる分岐構造をくみあわせて設計されたモチーフである。マイカなどの基板上に構造を作製できるため、大面積にナノ粒子やタンパク質を並べるための基盤として利用することもできる。



Reprinted with permission from Angew. Chem. Int. Ed. ©2009. [7]より許可の上転載

■ アルゴリズムック・セルフアセンブリ

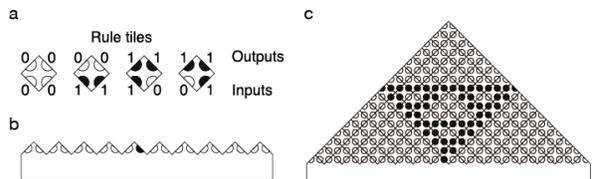
DNA タイルの粘着末端が一種類のペアだけであれば、おなじタイルが延々と続く二次元の平面構造ができるだろう。では、もしこの粘着末端のペアが複数あったらどうなるだろう？たとえば、1と0、二種類の粘着末端の配列を設計したとしよう。Aの右端はBの左端と1でもってつき、Bの右端はAの左端と0でもってつくようにすると、出来上がる構造は下図aのように、AとBが互い違いにつながったものになるはずだ。



[1]より許可の上転載

実際にこのような構造を作り、原子間力顕微鏡 (AFM) で観察してみる(b)と、突起物のないAタイルと突起物のあるBタイルが交互に並んだ縞模様が見てとれる。

このように、粘着末端の配列の種類(とそれに呼応したタイル自体の種類)を増やしていくことで、より複雑な模様を作ることができる。たとえば、1と0、二種類の粘着末端の配列を、今度は下記aに示すような4種類のタイルに割り当てる。



Reprinted with permission from Natural Computing ©2008. [8]より許可の上転載

ひとつだけ1のサイトを持つ初期構造(b)からこのDNAタイルを自己集合させていくと、シェルピンスキー・トライアングルとよばれる、複雑な三角形の模様を持ったパターン(c)があらわれる[9]。このように、タイルの「ルール」を定めることで、さまざま

な模様を作ることができる。じつは、このプロセスは1次元のセル・オートマトンと同じである。上図 a でいうところのタイルの下側が入力にあたり、それに対応した上側が出力となっている。右下、左下の値に応じて、左右上の出力が定まるようにタイルは設計されている。(図のルールは、じつは XOR の演算に対応している。) このように、粘着末端を利用して計算をおこない、結果さまざまなパターンを形成することのできる DNA タイルの自己集合を、「アルゴリズムック・セルフアセンブリ」とよんでいる。

さらに、この粘着末端の接続関係を、0 と 1 といった二種類のバリエーションからさらに推し進め、すべての粘着末端のペアに異なる配列を割り当てれば、タイル同士の相対的な位置関係を一意に定める(形状を決める)ことができる。これをシングル・ストランド・タイル(Single-stranded tile, SST) に実装することで、任意の 2 次元・3 次元形状の作製を可能にしたのが「DNAブリック(コラム1参照)」とよばれる手法である。

コラム1 DNAブリック

DNAブリックとは、Single-stranded tile (SST) [14] とよばれる DNA タイルをもとにつくられた2次元・3次元形状のことを指す。DNA タイルの設計は一般的に、形状を規定する「モチーフ」と、接続を規定する「粘着末端」のふたつを分けて考えるケースがほとんどである。ところがこの SST の場合、粘着末端同士が接続された時に形成される二重らせんそのものがタイル自体の形状も規定している、というのが特徴である。ひとつの一本鎖 DNA を4つのドメインに分け(右図 a)、それぞれの部分が隣接した SST と接続されることで、ハーフクロスオーバー分岐(ヒンジ部分が一本の DNA で構成される構造)を介して複数の二重らせんが並んだ構造が作製できる。一本の DNA そのものがひとつのタイルに対応し、さらに内部に形状を規定するような構造を設計する必要がないということで、現在よく用いられている DX タイルよりもコンパクト、かつシンプルな配列設計を可能としている。

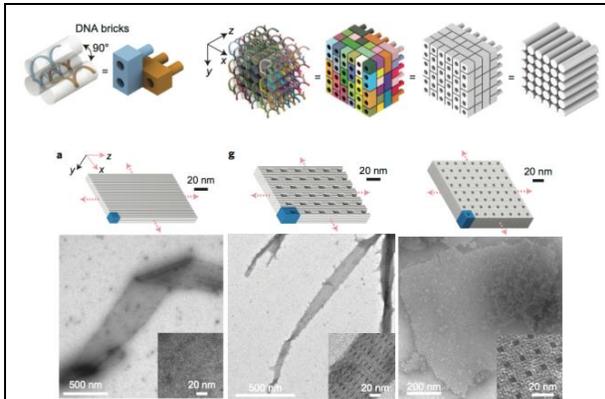
DNAブリックは、この SST の構造上の特徴を活かしさらに発展させることで、DNA オリガミよりもさらに解像度の高い(3次元構造の場合 8bp) 任意の形状設計を可能にしている。仮に、構造を作るタイルの種類を極限まで増やすということを考えてみよう。あるタイルの粘着末端の配列が、異なる種類のタイルにある一箇所の粘着末端のみとしか接続できないように配列を設計すれば、構造を構成するタイルひとつひとつの種類がすべて異なってくる。つまり、ある種類のタイルの位置関係が、相対的に構造全体の中で一意に定まることになる。DX タイルなど、複数本の DNA を必要とするタイルであれば、それぞれのタイルの内部構造についても配列の直交性を考慮する必要があるため、この戦略を取ることは現実的には難しい。しかし SST の場合、内部の形状をもたず、粘着末端の配列のみを考えれば良いため、この戦略を取る事が可能となる。

DNA オリガミの場合は、スキヤフォールド DNA の配列が位置関係を定める役目を果たしているが、この DNA ブリックの場合は、それぞれのタイル内部のドメインの配列とそれらの組み合わせが、位置関係を決めていると捉えることができるだろう。

実際の構造作製の手順としては、下図 b に示すように、あらかじめ「キャンバス」となる四角形や立方体の構造を構成する SST の配列セットを設計しておく。このなかから狙った形状を構成するサブセットを選び、混ぜあわせアニールすることで、任意の形状を作製することができる。[15, 16] また、同様の考え方で互いにつながる単位構造を設計することで、結晶構造の作製にも成功している。[17]



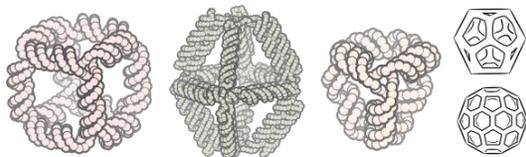
二次元の DNAブリックとその作製例。Reprinted with permission from Nature ©2012. [15]より許可の上転載。



DNA ブリックでつくった結晶構造. Reprinted with permission from Nature ©2014. [17]より許可の上転載.

コラム2 「閉じた」DNA ナノ構造

タイルやオリガミ，ブリックといった，二重らせんを二次元・三次元に並べた構造だけではなく，DNA で「閉じた形状」をつくることも可能である。(a)立方体構造[10]は，リガーゼを用いてつないだ，カテナン状のトポロジーを持つ複数本の環状 DNA で構成されている。(b) 8 面体構造[11]は，化学的に合成した DNA をつなぐことでつくった長鎖の一本鎖 DNA を，他の短鎖 DNA も加えつつ折りたたむことで作製された。(c) 4 面体構造[12]は，4 本の一本鎖 DNA のそれぞれが四面体のうちの 3 辺を通り，他の 3 本と辺ごとに相補となるように設計することで形成される。(d)DNA タイルのモチーフの例で紹介した三点分岐モチーフを用いて，球状の構造を作製することも可能である[13]。アニーリング時の濃度を変えることで，4 面体，12 面体，さらにはバッキーボール状の構造作製に成功した。



a は[14]から，b は[11]から，c は[12]から，d は[13]を参考に図を作成。

参考文献

- [1] Murata, S., Hamada, S. *Journal of the Robotics Society of Japan*. 28(10), (2010). [日本語での解説論文]
- [2] Winfree, E., Liu, F., Wenzler, L. A., Seeman, N. C. *Nature*. 394(6693) 539-544 (1998).
- [3] LaBean, T. H., Yan, H., Kopatsch, J., Liu, F., Winfree, E., Reif, J. H., Seeman, N. C. *J. Am. Chem. Soc.* 122(9) 1848-1860 (2000).
- [4] Yan, H., Park, S. H., Finkelstein, G., Reif, J. H., LaBean, T. H. *Science*. 301(5641) 1882-1884 (2003).
- [5] He, Y., Chen, Y., Liu, H., Ribbe, A. E., Mao, C. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (35) 12202-12203 (2005).
- [6] Yin, P., Hariadi, R. F., Sahu, S., Choi, H. M. T., Park, S. H., LaBean, T. H., Reif, J. H. *Science*. 321 (5890) 824-6 (2008).
- [7] Hamada, S., Murata, S. *Angewandte Chemie International Edition*. 48(37), 6820-6823 (2009).
- [8] Fujibayashi, K., Zhang, D. Y., Winfree, E., & Murata, S. (2008). *Natural Computing*, 24.
- [9] Rothmund, P. W. K., Papadakis, N., & Winfree, E. (2004). *PLoS Biology*, 2(12), e424.
- [10] Chen, J., & Seeman, N. C. (1991). *Nature*, 350(6319), 631.
- [11] Shih, W. M., Quispe, J. D., & Joyce, G. F. (2004). *Nature*, 427(6975), 618-621.
- [12] Goodman, R. P., Schaap, I. A. T., Tardin, C. F., Erben, C. M., Berry, R. M., Schmidt, C. F., & Turberfield, A. J. (2005). *Science* 310(5754), 1661-1665.
- [13] He, Y., Ye, T., Su, M., Zhang, C., Ribbe, A. E., Jiang, W., & Mao, C. (2008). *Nature*, 452(7184), 198-201.
- [14] 小宮 健, 瀧ノ上 正浩, 田中 文昭, 浜田 省吾, 村田 智. DNA ナノエンジニアリング 近代科学社 (2011)
- [14] Yin, P. *et al. Science* 321, 824-826 (2008).
- [15] Wei, B., Dai, M. & Yin, P. *Nature* 485, 623-626 (2012).
- [16] Ke, Y., *et al. Science* 338, 1177-1183 (2012).
- [17] Ke, Y. *et al. Nature Chemistry* 6, 994-1002 (2014).

21. DNA 修飾粒子 (SNA)

DNA ナノ構造の3つの作製アプローチのうち、金ナノ粒子などを核とし、そこに修飾した DNA を選択性的な結合として用いることで構造を形成する手法が、この SNA (Spherical Nucleic Acids) である。本項では、そのコンセプトを概説する。

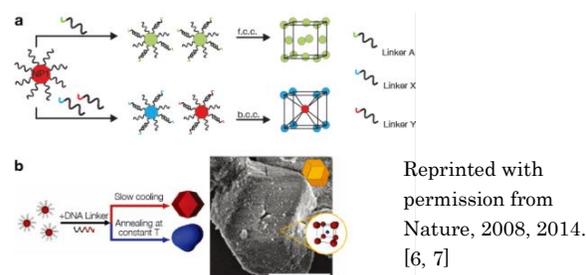
■ SNA (Spherical Nucleic Acids) とは

DNA のみをつかって構造を作る「折りたたみ」や「ハイドロゲル」といったアプローチに対し、この SNA は、構造の核にコロイド粒子を用い、ここに DNA を修飾することで、その相互作用によって結晶構造を作るというものである。この発想は、Mirkin ら[1]と Alivisatos ら[2]によって 1996 年に考案され(同号の *Nature* 誌に連続して掲載されている), その後、球形の粒子の周りに DNA が配置されたその外観から、Mirkin により SNA という総称が提唱されて本日に至る。DNA タイルとのアナロジーで考えると、タイルの場合、モチーフ構造がその剛性を規定するが、SNA の場合は、球状 (もしくは異方性のある形状) の粒子が構造の剛性を決定している、と考えれば分かりやすい。ただし、タイルとは異なり、SNA の場合は、粘着末端として機能する DNA が粒子表面全体に修飾されている。この DNA の集団相互作用により、化学でいうところの「原子価」や「結合」といった原子レベルのコンセプトを、コロイド粒子間の反応にそのまま適用できるという点がおおきな特徴となっている。つまり、自在に設計可能な DNA 同士のハイブリダイゼーションを粒子間の相互作用につかうことで、プログラム可能な、「原子と等価なふるまいをする」コロイド粒子が設計でき[3], その結果、結晶構造そのものの制御が可能となる。

■ ナノ粒子への修飾と構造形成

現在のところ、比較的簡便な作製手法が確立されていることから、ナノ粒子には金が材料として選択されることがほとんどである。チオール基を修飾した DNA を化学合成し、これと金ナノ粒子を混ぜ、DNA 同士の反発を抑えるようにイオン濃度を調整したバッファ下で反応させることで、粒子表面に修飾する、

というのが一般的な作製手順である。たとえば下図のように、リンカーとなる DNA で修飾された粒子間をつなぐことで、面心立方格子(f.c.c.)や体心立方格子(b.c.c.)をもつ結晶構造が得られている(a) [5,6]。また近年では、アニーリングによって、ウルフ多面体とよばれる単結晶構造をマイクロスケールで得ることも成功している[7,8](b)。DNA によるナノスケールでの相互作用の結果が、結晶成長学では平衡形として知られる巨視的な形状の形成に至ったという点で、重要な意味を持っている。



参考文献

- [1] Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., Mucic, R. C., Storhoff, J. J., & Storhoff, J. J. (1996). *Nature*, *382*(6592), 607–609.
- [2] Alivisatos, A. P., Johnsson, K. P., Peng, X., Wilson, T. E., Loweth, C. J., Bruchez, M. P., & Schultz, P. G. (1996). *Nature*, *382*(6592), 609–611.
- [3] Jones, M. R., Seeman, N. C., & Mirkin, C. A. (2015). *Science*, *347*(6224), 1260901. [レビュー]
- [4] Zhang, C., Macfarlane, R. J., Young, K. L., Choi, C. H. J., Hao, L., Auyeung, E., et al. (2013). *Nature Materials*, *12*(8), 741–746.
- [5] Nykypanchuk, D., Maye, M. M., van der Lelie, D., & Gang, O. (2008). *Nature*, *451*(7178), 549–552.
- [6] Park, S. Y., Lytton-Jean, A. K. R., Lee, B., Weigand, S., Schatz, G. C., & Mirkin, C. A. (2008). *Nature*, *451*(7178), 553–556.
- [7] Auyeung, E., Li, T. I. N. G., Senesi, A. J., Schmucker, A. L., Pals, B. C., la Cruz, de, M. O., & Mirkin, C. A. (2014). *Nature*, *505*(7481), 73–77.
- [8] Hamada, S., Tan, S. J., & Luo, D. (2014). *Nature Materials*, *13*(2), 121–122. [解説]

浜田省吾 (コーネル大学)

22. DNA ハイドロゲル

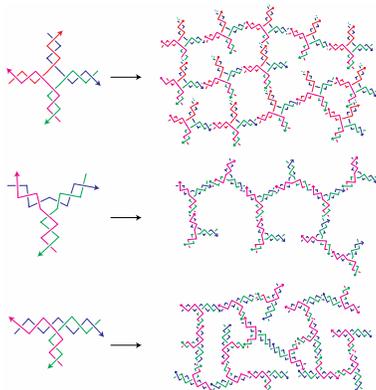
構造 DNA ナノテクノロジーの3つのアプローチのなかでも、もっとも最近になって考案されたのがこの DNA ハイドロゲルである。DNA を組み合わせてネットワークを作るこの手法の概要と、これまでに考案されてきたゲルの例、作製したゲルの検証方法とその応用について概説する。

■ はじめに

DNA を使った構造作成手法の中でも、溶液中でネットワークを作製することでマクロスケール（マイクロ～センチメートルオーダー）の構造をつくる方法が、DNA ハイドロゲルである。このトピックでは、現在知られている DNA ハイドロゲルの概要と、その作製方法・検証の手法、そしてこれらをつかった応用例について概説する。

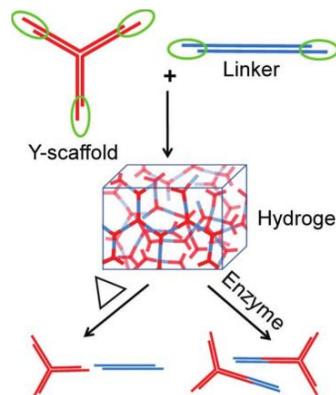
■ 化学ゲルと物理ゲル

一般的に、ゲルはそのネットワークのクロスリンク（架橋）の方法によって2種類に大別される。



Reprinted with permission from Nature Materials, 2006. [1]

ひとつめは化学ゲルである。化学ゲルはクロスリンクが共有結合によってなされたもので、結果、構造自体を破壊しないかぎり、全体のネットワークが壊れる（溶ける）ことはない。DNA のみを使った化学ゲルの例としては、先にも紹介したモチーフベースの設計[1]が広く知られている。具体的には、粘着末端を持つ X,Y,T 字などの形状を持つ分岐を、リガーゼによる酵素反応で接続する。これにより、二重らせんが組み合わさった強固なネットワークを作製することができる。

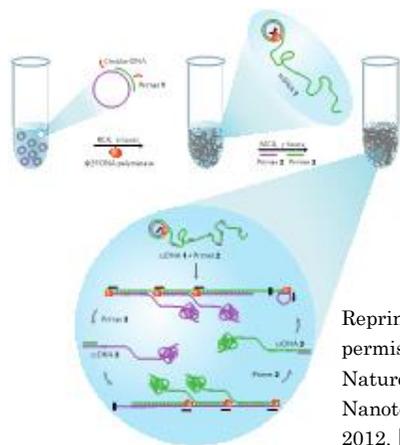


Reprinted with permission from Advanced Materials, 2011. [2]

もうひとつは物理ゲルである。物理ゲルは水素結合や物理的なからみあいなど、共有結合以外を用いてクロスリンクしたゲルのことを指す。化学合成した DNA を用いて物理ゲルを作った最初の例のひとつとしては、Liu らによるモチーフベースの設計がある [2]。これは、Y 字型の形状を持つ分岐同士を、両端に粘着末端をもつ二本鎖のリンカーを介して接続することで、ゲルを形成するという手法である。さらに、ハイブリダイゼーションを介して特異的に接続できる DNA の利点を生かしつつも、ネットワークをかたちづくるバックボーンとしては他の高分子を利用することで、ゲルを作製した例などもある [3]。また、最近ではこのような物理的な架橋をして形成する DNA ハイドロゲルを 3D プリンタと組み合わせることで、二・三次元形状をマクロスケールで形成するという報告もされている [4]。

DNA を用いた物理ゲルのもうひとつの作成手法としては、DNA ポリメラーゼと呼ばれる酵素を用いたものがある [5]。(DNA ポリメラーゼは、プライマーを起点としてテンプレートに相補となる DNA を伸長させる機能を持つ。) 簡単にそのプロセスを解説しよう。まず、環状のテンプレートとなる DNA を

用意し、その相補配列を持つプライマー-DNA (プライマー1) をハイブリダイゼーションさせたいので、DNA ポリメラーゼを使って、プライマー1の伸長反応を開始させる。このポリメラーゼは強力な鎖置換能を有しており、結果、テンプレートの相補となる配列を繰り返し持った長い一本鎖 DNA を作製することができる。このプロセスを、RCA (Rolling Circle Amplification) とよぶ。ある程度この初期反応を進ませて十分に最初の一本鎖 DNA を伸ばしたところで、今度はこれに相補な配列を持つプライマー2 と、最初に用いたプライマー1 とおなじ配列を持つプライマー3 を再度溶液に投入し、ここからさらなる伸長反応を開始させる。この新たに投入したプライマー2 は、最初の段階で作製した長い一本鎖 DNA を今度はテンプレートとすることで伸長反応を開始する。一方プライマー3 は、最初の長い一本鎖と、プライマー2 によってあらたにつくられた長い一本鎖にハイブリダイゼーションすることで伸長反応を引き起こす。結果として、作製された DNA は互いに複雑に絡み合い、ネットワークが形成されゲルとなる。

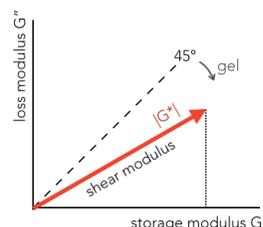


Reprinted with permission from Nature Nanotechnology, 2012. [5]

■ 検証の方法

作製した構造が「ゲルであるかどうか」を確認する方法のなかでも、最も一般的に用いられる手法として知られているのが、レオメータを用いた動的粘弾性の測定である。動的粘弾性測定とは、試料に正弦波となるように応力を加え、それに対するひずみ応答を測定、この位相差と振幅から、弾性成分である

貯蔵弾性率 G' (簡単にいえば、試料がどれだけが固体らしい振る舞いをするかを表す)と、粘性成分である損失弾性率 G'' (一方で、どれだけ液体らしい振る舞いをするかを表す) を算出する。 $G' > G''$ であるときに、測定試料がゲルであると定義されている。



■ 応用

DNA ハイドロゲルの応用先として最も有力なもののひとつが、プラスミドなど、遺伝子を含む DNA をゲルのネットワークに組み込むことで、ゲル内部でのタンパク質の無細胞合成を促進させるというものである。[6] 実際にタンパク質を合成させたところ、溶液中と比較しておよそ 300 倍の効率で生産できることが確認されている。このとき DNA ハイドロゲルは、遺伝子の (分子構造の) 保護、通常の溶液と比較した際にゲル中に存在する遺伝子の濃度の上昇と、酵素反応自体のターンオーバーの効率化による転写効率の向上、といった点から効率の向上に寄与しているのではないかと考えられている。

参考文献

- [1] Um, S. H., *et al.* Nature Materials, 5(10), 797–801 (2006).
- [2] Xing, Y., *et al.* Advanced Materials, 23(9), 1117–1121 (2011).
- [3] Nagahara, S., *et al.* Polymer Gels and Networks, 4(2), 111–127. (1996).
- [4] Li, C., *et al.* Angew. Chem. Intl. Ed, 54(13), 3957–3961 (2015).
- [5] Lee, J. B., *et al.* Nature Nanotechnology, 7, 816–820 (2012).
- [6] Park, N., *et al.* Nature Materials, 8(5), 432–437 (2009).

浜田省吾 (コーネル大学)

23. 概論 DNA ナノマシン, ナノロボット

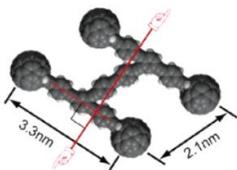
DNA で「形」がつけられるなら, 次は「動き」だ. 動きをつくる方法にはどんなものがあるだろうか.

■ 分子マシンとは

分子マシン (分子機械) は, 「刺激の入力にตอบสนองして, 一定の方向性を持つ動きを起こす分子」と定義される. 一般には, 複数の状態があり, それらの間を繰り返し遷移するものが考えられている.

生物はきわめて精巧にできた分子マシンの塊である. 細胞の中では, タンパク質でできたいろいろな種類の分子マシンがたくさん働いている. たとえば, バクテリアのべん毛を回転させる分子モーターは細胞膜内外のプロトン濃度差によって駆動される. また筋肉は, アクチンとミオシンと呼ばれるタンパク質の繊維が ATP の加水分解のエネルギーをつかってすべり運動をおこすことにより収縮する. このほかにも, ほとんどの生物が ATP 合成に用いている F 型 ATP 合成酵素はそれ自体が回転することによって合成反応を行っている. こういった生体の分子マシンは, いずれもきわめて効率が良いことが特徴である.

これに対し, 人工の分子マシンは, カテナン (鎖のように輪がつながった形の分子) とカロタキサン (輪の中をひもが通っているが, ひもの両端が大きいために輪がはずれないような構造の分子) をジョイントや軸受けのように見立てて, 可動部のある分子構造をつくったものである. これらは分子シャトルとか分子ピンセットと呼ばれている. また, ナノカーと呼ばれるものもある. ナノカーの 4 つの車輪はフラーレンでつくられ, 車軸は炭素・炭素の共有結合により無限回転できるようになっている. ナノカーは熱揺らぎにより金表面をまっすぐに動くことが観察されている [1].



ナノカー Reprinted from Nano Letter ©2005 ACS

これらの人工の分子マシンは, 合成有機高分子としては巨大なものであるが, その運動は往復運動や回転運動といった比較的単純なものに限られている.

■ DNA ナノマシン

DNA を使えば, もっと複雑な動きができる. さらにその動きを制御することも可能である. DNA ナノマシンの駆動方法には次のようなものがある.

DNA ナノマシンの駆動方法

外部駆動

- 鎖置換 (DNA 入力) *
- BZ 遷移 (塩濃度変化)
- 光応答性塩基 (光入力)

自律駆動

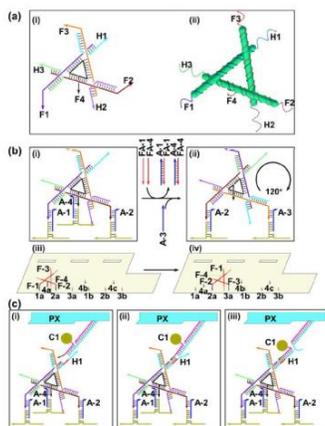
- 酵素反応 (DNAzyme, 制限酵素) *
- 鎖置換 (DNA 入力を自律化) *

* 配列特異的・・・特定の配列だけ駆動できる

外部駆動というのは, 一定の入力信号を外部から与えるもので, 信号が入力されるたびに, ナノマシンが一ステップずつ動く. 自律駆動というのは, 外部から信号を与えなくても, 分子マシンが自律的に動く (あるいはそのために必要な分子信号が順次生成される) というものである.

外部駆動の方法として, もっとも一般的なものは鎖置換である (☞ 42). この場合は, 種類の異なる DNA 一本鎖を一つずつ, ピペット操作で溶液に加えていく. 加えられた DNA 一本鎖が DNA ナノマシンの構造の一部を置き換えることにより, ナノマシンの形が変わり, それが 1 ステップの動作になる. その代表的なものは鎖置換反応によって動く分子ピンセットである (☞ 24). 鎖置換反応を用いる駆動法の利点は, どこを置換するか選べることである. ピンセット以外にもウォーカー (☞ 25) やペンチ (☞ 26) などいろいろなバリエーションがある. 鎖置換

反応を用いたナノマシンとして、今のところもっとも複雑なものは、Seeman のグループが開発したナノ組み立て工場である (☞ 26).

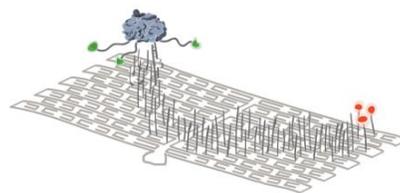


ナノ組み立て工場

Reprinted with permission from Nature, 2010 [3]

BZ 遷移をもちいた駆動方法は、CGCGCG...という塩基配列をもつ DNA がイオン濃度に応じて、右ねじの B 型から左ねじの Z 型に遷移することを利用する。ピペット操作で溶液中のイオン濃度を変えることでこのマシンは何度でもねじり運動を行うことができる。また、アゾベンゼンのような光応答性の人工塩基 (☞ 48) を組み込んだナノマシンもある。アゾベンゼン分子が光照射により異なる形態をとることを利用して、UV 光照射によりアゾベンゼンを含んだ DNA2 本鎖の結合・解離を制御することができる。これら BZ 遷移や光応答性塩基をつかった駆動では、入力に対してすべてのアクチュエータが同時に動いてしまい、複雑な動作の駆動には向かない。

一方、自律駆動の分子マシンの例は多くない。その代表例は、自律駆動型のウォーカーである (☞ 25)。自律駆動型ウォーカーは 2 次元 DNA オリガミ (☞ 18) の上に作られたウォーカーが結合するためのトラック DNA の列を、ウォーカーの脚についた DNazyme 配列 (☞ 30) 断することで歩行動作を実現している。ここでは、トラック DNA が一本切れるたびに、ウォーカーが一步進み、次のトラック DNA と結合するというサイクルが自律的に繰り返されるため、外部からの入力を必要としない。

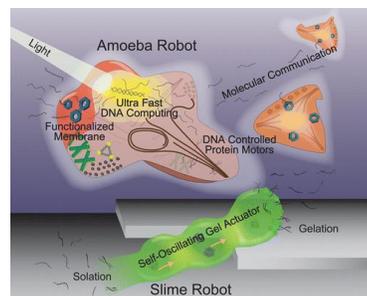


DNazyme 配列をもちいた自律ウォーカー

[4]を参考に図を作成

■ アメーバロボット

これまでに説明した分子マシンは、いずれも溶液中に単分子として存在し、その形状や結合状態が順次変化することで動作するものであった。分子ロボティクスプロジェクト (☞ 1 コラム) では、その次の段階として、リポソーム (☞ 89) などの反応容器の中に、DNA 計算回路と分子アクチュエータを封入して、アメーバのような動きをさせることを目指している。これまでに、微小管に DNA タグをつけることによって、微小管を集合させたり分散させたりすることができており、それを自律的な DNA 反応系 (☞ 27) で制御することが目標になっている[2].



アメーバロボットのイメージ [2]

Reprinted from Accounts on Chem Res. ©2014 ACS

参考文献

- [1] 最新分子マシン, ナノで働く”高度な機械“を目指して, 東京化学同人, 2008 年
- [2] Hagiya et al. Molecular robot with sensors and Actuators, Accounts of Chemical Research, 2014, 47(6), 1681-1690.
- [3] Gu et al. A proximity-based programmable DNA nanoscale assembly line. Nature, 465, 202-205, 2010
- [4] Lund et al. Molecular robots guided by prescriptive landscapes. Nature, 465, 206-210, 2010

村田 智 (東北大学)

24. DNA ピンセット

温度や pH などの溶液条件を変えずに、DNA の構造を配列特異的かつ可逆的に変化させて機械的な仕事をする DNA ナノマシン. その先駆けである DNA ピンセットのために考案された鎖置換反応は、多くの DNA ナノマシンや DNA 論理ゲートの動作機構として用いられている。

■ DNA ナノマシン

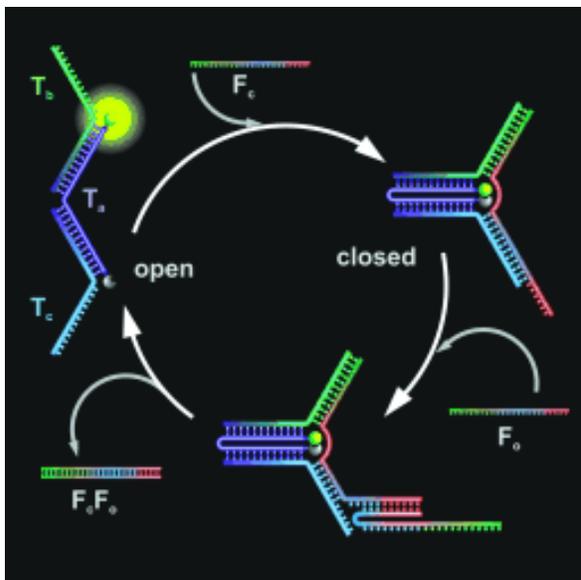
マイクロメートルよりも小さなナノメートルサイズの機械をつかって動かすには、どうすればよいだろう？ DNA 分子は配列特異的に相補鎖とハイブリダイゼーションし、ランダムコイル様の一本鎖状態から、比較的堅いロッド様の二本鎖状態へと変化する (☞ 40). この自己会合する性質を利用して、二次元・三次元のナノ構造体を作成することが可能である (☞ 17). もし、このようにしてつくったナノ構造体を繰り返し構造変化させることができるなら、ナノサイズの機械が実現できる。

分子でつくった機械に対し、それが存在する環境の条件、たとえば溶液の pH やイオン強度を変化させれば分子の構造が変化するだろう。しかし、環境変化に対する構造変化の特性が異なる多様な分子を用意し、それらを組み合わせて複雑な機械動作を実現するのは難しい。また、溶液中でいっせいに起こる環境変化で複数の分子機械を個別に制御したり、協調的に動作させたりすることはさらに困難だ。DNA でナノ構造体を作成するときのように、DNA 分子の配列特異的なハイブリダイゼーションによって、いったん作成した構造を可逆的に変化させることはできないだろうか。

DNA の自己会合を利用するナノ構造体の作成は、熱力学の視点で見ると、自由エネルギー的に有利な状態に向かって進行するプロセスだ。適切に相補配列が配置されるように設計することで、DNA 分子を混合するだけで膨大な数の構造体がひとりでに組み上がる。それならば、いったん構造体を形成した後に、構造体中の DNA 鎖と結合してよりエネルギー的に有利な状態となる配列を持つ DNA 鎖をさらに投入すれば、原理的には構造が変化するはずである。

しかし、可逆的に構造変化するには、いったん形成された相補鎖どうしの結合をひきはがし、別の相補鎖との間で新しく塩基対を組み直すという、自由エネルギー的に不利な状態を通る必要がある。それには気の遠くなるような時間がかかり、実用的な時間内で動作する機械を実現することは不可能と考えられていた。だが、Yurke たちは「DNA ピンセット (DNA tweezer)」でそれをやってみせた [1]。

■ DNA ピンセットの動作概要



C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, **41**, 3779 より許可を得て転載。

DNA ピンセットは、3本の DNA 鎖からなる単純な構造体に、構造変化を指令するシグナルかつ燃料の役目を果たす2本の DNA 鎖を順番に投入することで動作する。1本の DNA 鎖 (T_a) と、その 5' 側、3' 側の各部分に対して相補的な配列を持つ2本の DNA 鎖 (T_b, T_c)、計3本の DNA 鎖がハイブリダイ

ゼーションすると、図左上のように2本の固いロッドをヒンジで連結したピンセットのような構造体ができる。2本のロッド部分からはそれぞれ一本鎖の部分が突き出ており、双方の突出部分と相補的な配列を持つDNA鎖(F_c)を投入するとハイブリダイゼーションして、ピンセットは閉じた構造へと変化する。ここで、投入されたDNAは配列特異的に構造変化を指令した“シグナル”であると同時に、自由エネルギー的に有利な状態に向かって進行する構造変化を駆動させた“燃料”であると考えられる。

次に、構造体に結合した F_c を、やはりシグナル兼燃料となる別のDNA鎖で引きはがすことができれば、可逆的な機械動作が達成される。図下部の構造では、二本鎖部分の末端から突出した「足がかり(Toehold)」と呼ばれる一本鎖の部分に、これと相補的な配列を持つDNA鎖(F_o)が結合している。 F_o は、先ほど形成した二本鎖中の配列とも相補的な配列を持っており、塩基対の交換が起こる。塩基対の交換は自由エネルギー的にほとんど変化のないプロセスであり、ランダムウォーク的に進行する。 F_c の塩基対がすべて置き換わると、 F_c と F_o が結合した二本鎖構造体が排出物(Waste)として放出されて、DNAピンセットは元の開いた構造に戻る。ここで用いられた「鎖置換反応」と呼ばれる反応は、その後の多くのDNAナノマシンや酵素フリー型DNA論理ゲートの動作機構として利用されている。

■ DNAピンセットの動作確認実験

数千塩基対からなるDNAオリガミ構造体などと比べると、100塩基対に満たないDNAピンセットは非常に小さく、AFM観察でその形をみることはできない。正しく動作しているかどうかは、多数のDNAピンセットの動作を反映した蛍光の変化を、バルク溶液で観測して確認するのが一般的である。図中に小さな球で描かれているように、蛍光基と消光基でDNA鎖の末端を修飾しておく。 F_c 鎖を投入してDNAピンセットが閉じると、蛍光基と消光基が接近して蛍光が減少するため、閉じた構造が形成された

ことが確認できる。続いて F_o 鎖を投入して蛍光が増大したら、DNAピンセットが再び開いて可逆動作を完了したことが確認できる。また、DNAピンセットの開閉にともなって発生する力の大きさは、熱力学的な計算から約15 pNと見積もられており、天然のタンパク質分子モーターであるキネシンやミオシンと同程度の力を発生できると考えられる。

■ 最近の発展

DNAピンセットは、開閉動作を行うたびにDNA溶液を加える必要がある。反応溶液が閉鎖系の場合は、この操作によってDNAピンセット濃度が希釈されるため、DNA溶液の添加を繰り返すと動作効率は徐々に低下する。また、Wasteが蓄積して予期しない相互作用が起こるおそれもある。浅沼たちは、アゾベンゼンを用いてハイブリダイゼーションを光制御することで、DNAの添加が不要なUV光によるDNAピンセットの開閉動作を報告している[2]。

またYanたちは、DNAでより大きなピンセット様構造を作成し、その先端にそれぞれ酵素と補因子を結合させることで、酵素反応をDNAピンセットの開閉動作によって制御するナノリアクターを構築した[3]。DNAピンセットが閉じて脱水素酵素と NAD^+ が接近すると、開いている状態と比べて酵素反応が5倍以上促進される。開閉動作によって酵素反応を促進もしくは抑制して制御できることが確認された。今後、DNAピンセットを活用したより複雑な機械動作や、それを利用した精密な反応制御の実現が期待される。

参考文献

- [1] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, Jr., F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature*, 2000, 406, 605.
- [2] X. Liang, H. Nishioka, N. Takenaka, H. Asanuma, *ChemBioChem*, 2008, 9, 702.
- [3] M. Liu, J. Fu, C. Hejesen, Y. Yang, N. W. Woodbury, K. Gothelf, Y. Liu, H. Yan, *Nature Communications*, 2013, 4, Article number: 127.

小宮 健 (東京工業大学)

25. DNA ウォーカー

DNA でつくられた足場の上で、単純な DNA 構造体が結合と解離を繰り返して移動する DNA ウォーカーは、これまでにいろいろなタイプの歩行機構が提案されている。DNA を逐次投入して一歩ずつ歩行を制御する DNA 応答型、および酵素反応やヘアピン DNA の結合を利用する自律歩行型 DNA ウォーカーを紹介する。

■ 分子が歩く

前節では、DNA でできたナノ構造体が繰り返し開閉動作する DNA ピンセットについて解説した。本節では、ナノ構造体が移動する「DNA ウォーカー」を紹介する。まず、“分子が歩く”イメージを確認しておこう。日常生活では重力があるため、体は地面に接しており、何もしなければその場から移動することはない。しかし、ナノメートルサイズの分子の世界ではその逆に、何もしなければ溶液中の分子はブラウン運動でどこかへ吹き飛ばされてしまう。分子が歩くためには結合する“足場”が必要である。

生体内では歩行するモータタンパクのための足場が張り巡らされていて、その上を移動することで分子の輸送などを実現している。DNA ウォーカーの場合は、同じく DNA でつくられた構造体が歩行のための足場となる。構造体上のある部位に結合した DNA ウォーカーが、別の部位に結合して元の部位から解離する、という動作を繰り返すことで、足場である DNA 構造体の上を歩行する。

■ DNA 応答型 DNA ウォーカー

Pierce たちは、DNA ピンセットにおいて考案された鎖置換反応を利用して歩行する DNA ウォーカーを構築した(図1) [1]。図の上部に描かれた、2本の DNA 鎖が部分的にハイブリダイゼーションした構造体が DNA ウォーカーで、一本鎖の領域がウォーカーの「足」の役割を果たす。これに対し、下部に描かれた複数の DNA 鎖がハイブリダイゼーションしてできた構造体からも、一本鎖の領域が突き出している。この一本鎖領域を「固定子 (Stator)」と呼ぶ。ここに歩行動作のシグナルかつ燃料となる DNA 鎖を加えていく。まず A1 を加えると、相補配列どうしが結合してウォーカーの一方の足が固定子の一つ

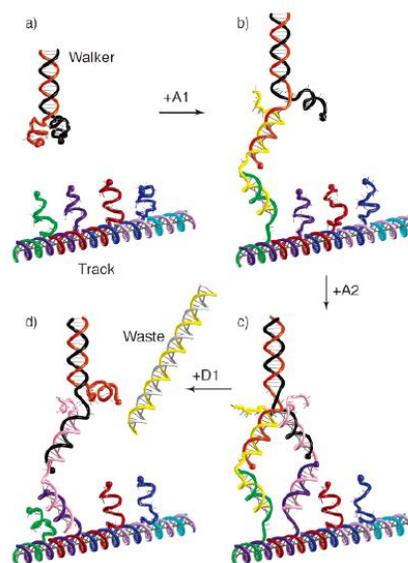


図1. DNA 鎖 A1, A2, D1 をそれぞれ黄色, ピンク, 灰色で示す。参考文献 [1]より許可を得て転載。Copyright ©2004, American Chemical Society.

に足を下ろす。次に A2 を加えると、ウォーカーのもう一方の足も隣の固定子に足を下ろす。このとき、加えた DNA の一部の領域は一本鎖のままで残り、鎖置換反応の足がかり (Toehold) となる (☞ 42)。その次に、A1 の全長に対する相補配列を持つ D1 を加えると、鎖置換反応によって A1 がウォーカーの足および固定子から解離し、ウォーカーの一方の足が上がった状態に戻る。以上のように足を上げ下ろしする歩行動作を、足の先端に消光基、固定子の先端に蛍光基をそれぞれ修飾しておくことで、蛍光分光光度計を用いた観測によって確認した (☞ 81)。

■ 酵素反応を利用する DNA ウォーカー

DNA ウォーカーは、相補配列との結合と解離を繰り返して歩行するが、酵素反応と組み合わせる歩行に方向性を持たせるころみが行われてきた。これま

で制限酵素とライゲースを使用するものや、DNAzyme を使用するものなどが報告されている。ここでは、ニッキング酵素による不可逆的な DNA の切断反応を使用するのを見てみよう(図2) [2].

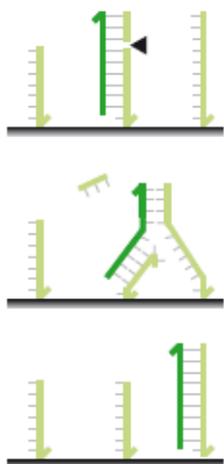


図 2 . J. Bath, A. Turberfield, *Nature Nanotech.* 2007, 2, 275 より許可を得て転載. 緑色が DNA ウォーカー, 黄緑色が固定子 DNA, 黒い三角が切断点を表す.

断が起こり、直線的に並んだ固定子上をウォーカーが一方向に進んでいく。最初の報告では、やはり蛍光分光光度計を用いた観測で歩行動作の確認が行われていたが、その後、高速 AFM を用いた動画撮影によって 1 分子の歩行動作が計測されている [3].

■ ヘアピン DNA を利用する DNA ウォーカー

DNA は分子内に互いに相補的な部分配列があると、結合してヘアピン構造をとる。全長に対する相補配列を持つ DNA と分子間でハイブリダイゼーションする場合と比べると、ヘアピン構造の方が自由エネルギー的には不安定であるが、速度論的 (kinetic) にハイブリダイゼーションを抑制するので、足がかりとなる配列をうまく設計すると、多段階にハイブリダイゼーションする反応経路をプログラムすることができる。Yin たちはこの手法を使って、分岐構造体の触媒的 (catalytic) な形成や、自己触媒的な

二本鎖 DNA 生成などの興味深い反応システムを構築した [4]. そのなかで、DNA だけで自律歩行する DNA ウォーカーを提案している (図3). ウォーカーは 2 本の DNA 鎖が部分的にハイブリダイゼーションした構造体で、二本鎖部分の両側に足となる一本鎖の領域がある。足場上の固定子はヘアピン構造を形成するように設計されており、歩行のための燃料となるヘアピン DNA が加えられても、固定子と直接は結合しない。ウォーカーが結合してヘアピン構造が開いた固定子とのみ、燃料となるヘアピン DNA が結合して足を解離させるようになっており、ウォーカーの歩行動作は自律的に進行する。

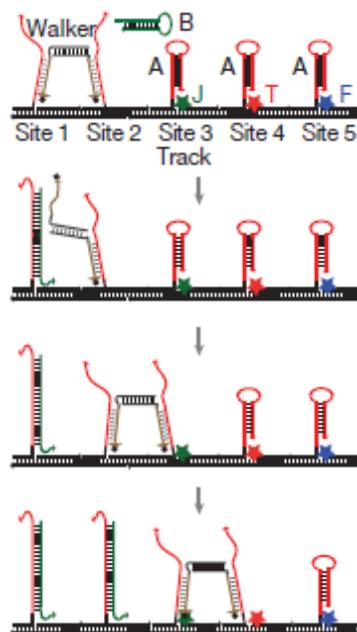


図 3 . 参考文献 [4] より許可を得て転載.

参考文献

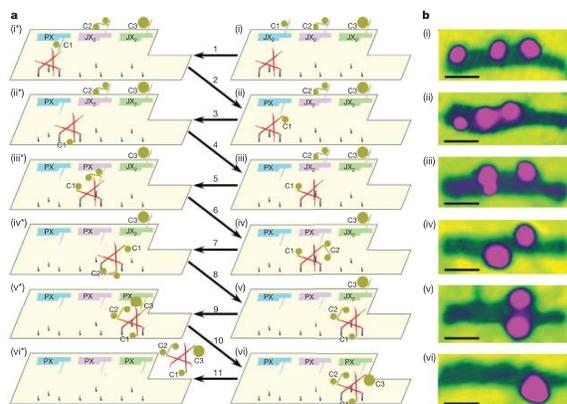
- [1] J.-S. Shin, N. Pierce, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 10834.
- [2] J. Bath, S. Green, A. Turberfield, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 4358.
- [3] S. Wickham, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, J. Bath, H. Sugiyama, A. Turberfield, *Nature Nanotech.*, 6, 166.
- [4] P. Yin, H. Choi, C. Calvert, N. Pierce, *Nature*, 2008, 451, 318.

小宮 健 (東京工業大学)

26. DNA ナノマシン

少数の短い DNA からつくられる DNA ピンセットやウォーカーには、あまり複雑な動作を行わせることはできないが、これらを DNA オリガミに組み込んでやると、何段階もの反応をプログラミングすることができるようになる。また、DNA オリガミそのものを動かす分子デバイスも開発されている。

■ DNA オリガミ上で DNA 分子マシンを動かす
DNA オリガミ分子上で初めて DNA 分子マシンを動かすことに成功したのは、やはり DNA 分子マシンの先駆者である Seeman らである。彼らは、2009 年に自身らの回転運動マシンを DNA オリガミ内に固定化し、その構造変化を AFM で可視化することに成功している。[1]さらにこの系を発展させ、彼らは DNA オリガミ上にナノメートルサイズの組み立て工場を再現した。[2]すなわち、DNA オリガミ上に一本鎖 DNA の足場を生やし、その上を三角形の DNA ウォーカーに歩かせる。さらに横からは三カ所の回転アームを組み込み、DNA ウォーカーが前にやってきたときに、金ナノ粒子の受け渡しができるようにしたのである。いかにも複雑な系であるが、彼らは AFM や電子顕微鏡などを駆使して、DNA ウォーカー上に狙い通りの粒子が積まれていることを見事に証明した。



Reprinted with permission from *Nature*, 2010.

同じように、DNA オリガミ上で DNA ウォーカーを歩かせたもう 1 つの例が、Lund らによる「DNA スパイダー」の系である。[3]「DNA スパイダー」とは、ストレプトアビジンというタン

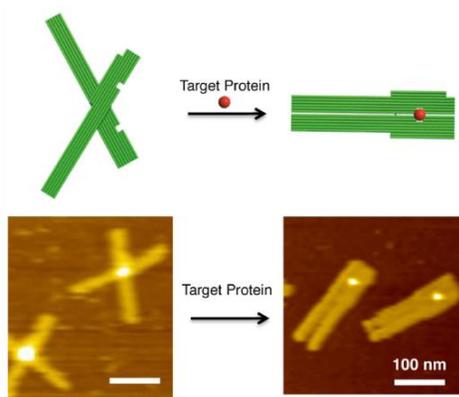
パクから、RNA 切断活性を持った特殊な DNA の足を三本生やしたもので、DNA オリガミ上に多数生やした RNA の足場を徐々に分解しながら、自発的に移動することができる。

一方、Turberfield らは、やはり 1 本鎖 DNA を DNA オリガミ上に並べたトラックを作成し、その上で彼らの酵素反応を利用した DNA ウォーカーを走らせている。[4]こ DNA ウォーカーの動きを 1 画像/秒で撮像できる高速 AFM を用いて、彼らは DNA ウォーカーが動いている動画を世界で初めてとらえることに成功した。さらに彼らは、トラック上に分岐点を設け、DNA ウォーカーが歩く方向を DNA 鎖のインプットにより制御することにも成功している。[5]

■ ナノメカニカル DNA オリガミデバイス

構造変化が実用的な機能に直結した世界初のナノメカニカル DNA オリガミデバイスとして、我々は長さ約 170 nm の 2 本のレバー部が支点一カ所で結合された、ペンチ型の可動式 DNA オリガミ構造体 (DNA ペンチ) を作成した。[6-9] DNA 二重らせん 6 本が束ねられて形成されるこれらのレバー部は、Holliday Junction からなる支点を中心に自在に回転でき、水溶液中では主に内角 60° の X 字型の構造をとっていると予想されている。実際に、DNA ペンチをマイカに吸着させて AFM 測定を行うと、X 字型に開いた構造物が多数観察される。これに対して、レバー部に様々な化学修飾を施すことにより、ターゲット分子との相互作用を利用してレバー間に第 2 の結合点を形成させることができれば、DNA ペンチを X 字型の開いた構造体へと構造変化させることができる。例えば、ビオチンをレバー部に修飾すれば、ストレプトアビ

ジンタンパクを一粒だけ掴んでペンチを閉じることが可能である。これを AFM で単分子イメージングすることにより、ターゲットタンパクを単分子レベルで検出できたことになる。このように可動変形する DNA オリガミデバイスを活用することで、質量数が最も小さい1である水素イオンから、分子量数百の小分子、さらには分子量数万のタンパクまでの幅広いターゲットを、単一の系で同時検出できる単分子検出系が実現したことになる。



ターゲットとの相互作用により DNA オリガミデバイスの構造変化を誘起し、これをターゲットの検出に利用したその他の例としては、光ピンセットを活用したタンパク質の検出系が Mao らによっても報告されている。[10]

■ DNA オリガミロボット

DNA オリガミの構造変化を機能と結びつけたもう一つの例として、Douglas らは、ターゲットとなる細胞を論理演算により認識して結合する「DNA ナノロボット」を報告している。[11] この DNA オリガミデバイスは、閉じた状態では差し渡し 35 nm の六角形の断面を持つ、長さ 45 nm の全体がワニの口のように開くような樽型構造をしている。ワニの口先は、細胞の分泌物を特異的に認識するアプタマーで閉じられており、この部分で相手があらかじめ設定されたターゲット細胞であるかを判定する。狙い通りのターゲットであった場合には、口を閉じていたアプタマーを含む

二重らせんが解離し、樽の内側に生やしておいた抗体断片が呈示されることで、DNA ナノロボットはターゲット細胞に結合する。Amir らは後に、同様の DNA ナノロボットを生きたゴキブリ中に注入し、機能を証明することまでしている。[12]

参考文献

- [1] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature Nanotech.* **2009**, *4*, 245.
- [2] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature*, **2010**, *465*, 202.
- [3] K. Lund, A. J. Manzo, N. Dabby, N. Michelotti, A. Johnson-Buck, J. Nangreave, S. Taylor, R. Pei, M. N. Stojanovic, N. G. Walter, E. Winfree, H. Yan, *Nature*, **2010**, *465*, 206.
- [4] S. F. J. Wickham, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, J. Bath, H. Sugiyama, A. J. Turberfield, *Nature Nanotech.*, **2011**, *6*, 166.
- [5] S. F. J. Wickham, J. Bath, Y. Katsuda, M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, A. J. Turberfield, *Nature Nanotech.*, **2012**, *7*, 169.
- [6] A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, M. Komiyama, *Nature Commun.*, **2011**, *2*, 449.
- [7] T. Yamazaki, Y. Aiba, K. Yasuda, Y. Sakai, Y. Yamanaka, A. Kuzuya, Y. Ohya, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11361.
- [8] A. Kuzuya, R. Watanabe, M. Hashizume, M. Kaino, S. Minamida, K. Kameda, Y. Ohya, *Methods* **2014**, *67*, 250.
- [9] A. Kuzuya, R. Watanabe, Y. Yamanaka, T. Tamaki, M. Kaino, Y. Ohya, *Sensors* **2014**, *14*, 19329.
- [10] D. Koirala, P. Shrestha, T. Emura, K. Hidaka, S. Mandal, M. Endo, H. Sugiyama, H. Mao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8137.
- [11] S. M. Douglas, I. Bachelet, G. M. Church, *Science*, **2012**, *335*, 831.
- [12] Y. Amir, E. Ben-Ishay, D. Levner, S. Ittah, A. Abu-Horowitz, I. Bachelet, *Nature Nanotech.* **2014**, *9*, 353.

葛谷明紀 (関西大学)

27. 自律的な DNA 反応系

自律型 DNA コンピュータ, 自律型 DNA ウォーカーなど自律駆動する分子ロボットの構築には自律的な DNA 反応系が欠かせない[1]. ここでは, 自律的な DNA 反応系をまとめておく. この技術は, 他の解説にあるシステムでも度々利用されているため, それらを参照できるようなポイントも示しておく.

■ 自律的な反応

「自律的」という言葉は曖昧さがあるので, この分野における意味を定義しておく. 通常, 化学合成で, 「ある反応が終わったら, その次の反応試薬を入れて反応させ, それが終わったらさらに試薬を追加し・・・」というように各ステップで実験作業を行わなければならない反応を自律的でない反応という. 反対に, 最初に試験管等に試薬を入れて反応を始めてしまえば, 多段階の反応が, DNA 塩基配列にプログラムされた情報などを基に, 逐次, 順序よく進んで行き, 正しい結果 (計算結果, 分子の合成・構造変化・動きなど) を出力する反応を自律的な反応という. 以下では, 自律的な反応系の具体例をいくつかピックアップして説明する.

■ Hybridization Chain Reaction (HCR)

Pierce らのグループは, Hybridization Chain Reaction (HCR)と呼ばれる, ある種の DNA 増幅系を開発した (図 1) [2]. この反応は, 2 種類のヘアピン DNA (H1 および H2) と反応開始のトリガーとなるイニシエーターの ssDNA (I) からなり, 酵素反応は一切使わず, ハイブリダイゼーション反応のみで自律的に進む. 図 1A にあるように, H1 と H2 があるだけでは反応は起こらない. ここに I が加えられると, I が持つ配列 a^* が H1 のトールド (足がかり) 配列 a にハイブリダイゼーションし, そのままブランチャイグレーションによって H1 のヘアピン構造が開かれる (図 1B). その結果, H1 が持つ配列 c が, H2 のトールド配列 c^* にハイブリダイゼーションし, ブランチャイグレーションによって H2 のヘアピン構造も開かれる. これにより H2 が持っている I と同じ配列 b^*a^* が露出し (図 1C), 以上が連鎖反応 (chain reaction) していく. その結

果, 2 本鎖配列が連続した長い DNA が生成されることになる. この HCR は, 微量のシグナル分子の検出に用いられるとともに, 自律型 DNA コンピューティング等にも利用できる.

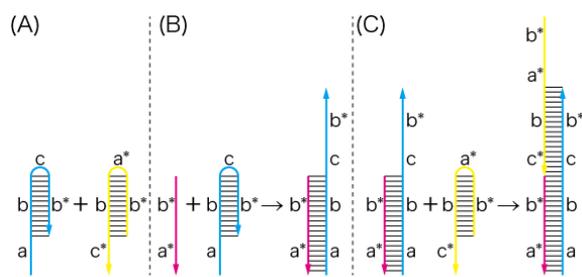


図 1. HCR のメカニズム.

■ Reverse-transcription-and-Transcription-based Autonomous Computing System (RTRACS)

陶山, 瀧ノ上, 木賀らのグループは, ウィルスが宿主細胞に感染して増殖する反応をヒントに, 逆転写反応 (Reverse transcription; RT) と転写反応 (Transcription) をベースにした自律型 DNA コンピュータ RTRACS (アールトラックス) を開発した [3,4,5]. 図 2 は RTRACS による AND ゲート [3] の構成である. RTRACS は, 入出力分子 (データ分子) に RNA を, プログラム分子に DNA を用いる. 入力された RNA input $r21$ は, 反応系内にあるプライマー DNA 1 とハイブリダイゼーションし, RT によって DNA が伸長される. RNA 分解酵素 (RNaseH; RH) によって, RNA が分解されると 1 本鎖の DNA 12 が生成される. DNA 12 は, もう一つの入力である RNA input $r32$ とハイブリダイゼーションし, RT によってさらに伸長する. RH によって RNA が分解されると 1 本鎖の DNA 123 となる. これが系内にあるコンバーター DNA にハイブリダイゼーションすると, DNA ポリメラーゼ (DP) によって, DNA が伸

長し、その結果配列内の T7 プロモータ配列が 2 本鎖化される。T7 RNA ポリメラーゼ (RP) は、この 2 本鎖化したプロモータ配列に結合し、その下流の RNA output r45 を転写する。このような一連の反応は、自律的に進行し、全体としては 2 つの RNA 入力によって、1 つの RNA 出力を生むという演算ができる。RNA がインターフェースとなっているので、ゲートをつないでより複雑な演算を行うことなどが可能となる。たとえば、ネガティブフィードバックループを作れば、振動反応ができる可能性もある[4]。

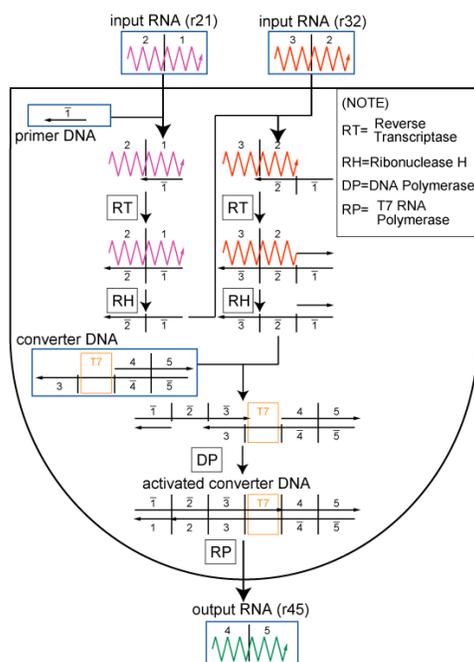


図 2. RTRACS による AND ゲート

■ Transcriptional bistable circuit and oscillator

Winfree らのグループは、転写反応を利用した双安定スイッチ (bistable circuit) や振動反応系 (oscillator) を開発している[6,7]。T7 RNA ポリメラーゼの反応は RTRACS に類似しているが、逆転写酵素を利用しないなどの違いがある。反応は複雑なので、詳細は論文を参照のこと。

■ その他の自律的な DNA 反応系

上記で説明した自律的な反応はほんの一部に過ぎない。本テキストの各所に様々な自律的 DNA 反応系が紹介されているのでリストアップしておく。

- DNA ウォーカー (☞ 25)
- DNA 論理ゲート (☞ 29)
- DNAzyme ロジック (☞ 30)
- エントロピー駆動ゲート (☞ 31)
- シーソーゲート (☞ 32)
- DNA Toolbox (☞ 33)
- Whiplash PCR (DNA 状態遷移機械) (☞ 34)
- DNA Automata (DNA 状態遷移機械) (☞ 34)

参考文献

- [1] 小宮健, 瀧ノ上正浩, 田中文昭, 浜田省吾, 村田智, “DNA ナノエンジニアリング”, 近代科学社 (2011/4/30), 202 ページ, ISBN: 978-4-7649-0402-6.
- [2] R. M. Dirks, N. A. Pierce, “Triggered amplification by hybridization chain reaction”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 15275–15278 (2004).
- [3] M. Takinoue, D. Kiga, K.-I. Shohda, A. Suyama, “Experiments and simulation models of a basic computation element of an autonomous molecular computing system”, Phys. Rev. E 78, 041921 (2008).
- [4] M. Takinoue, D. Kiga, K.-I. Shohda, A. Suyama, “RNA Oscillator: Limit Cycle Oscillations based on Artificial Biomolecular Reactions”, New Generat. Comput. 27, 107–127 (2009).
- [5] S. Ayukawa, M. Takinoue, D. Kiga, “RTRACS: a modularized RNA-dependent RNA transcription system with high programmability”, Acc. Chem. Res 44, 1369–1379 (2011).
- [6] J. Kim, K. S. White, E. Winfree, “Construction of an in vitro bistable circuit from synthetic transcriptional switches”, Mol. Syst. Biol. 2, 68 (2006).
- [7] J. Kim, E. Winfree, “Synthetic in vitro transcriptional oscillators”, Molecular Systems Biology 7, 465 (2011).

瀧ノ上正浩 (東京工業大学)

28. 概論 DNA コンピューティングとは

Adleman が実際に DNA 分子を用いて具体的な計算を行った後、多くの計算モデルを DNA 分子によって実装する試みが活発に行われて来た。鎖置換反応や酵素反応などの DNA 分子の各種の反応、それらに触発され考案された計算モデル、それらによって実装されるより普遍的な計算モデルについてまとめる。

■ DNA 分子で計算する

分子で計算しようとする提案・試みは古くから行われており、様々な系統がある。その一つは Bennett が 1982 年に行った可逆分子チューリング機械の提案である。この他にも、Conrad や Vaintsvaig と Liberman による提案がよく知られている。さらに遡って 1959 年には、ノーベル物理学賞を受賞した Feynman が、*There's Plenty of Room at the Bottom* と題する演説の中で、分子マシンの可能性について言及している (Feynman の演説)。

しかしながら、実際に分子を用いて具体的な計算が行えることを最初に示したのは Adleman である。1994 年に Adleman は、DNA 分子に対する実験操作を巧妙に利用することにより、有向ハミルトン経路問題を解くことに成功し、DNA コンピューティングと呼ばれる研究分野を創始した。狭義の(古典的な)DNA コンピューティングは、Adleman による解法の流れを汲む探索や最適化の手法を指すが、その後の DNA コンピューティング研究を俯瞰すれば、実に様々な計算モデルを、分子反応、特に DNA 分子の反応を用いて実現する試みが行われて来たことがわかる。したがって、DNA コンピューティングとは、一般に、計算モデルを、DNA 分子反応を用いて実現することを目指す研究(分野)と言うべきであろう。

次ページの図では、DNA コンピューティングによって実現することが試みられて来た各種の普遍的な計算モデルを網羅している。このような普遍的な計算モデルを DNA の反応によって実現しようとする過程で、DNA の反応に触発された汎用的な計算モデルが提案されている。

なお、Adleman の解法および類似解法は、いくつかのステップから成り立っており、様々な計算モデルの側面を有している。特に有向グラフの経路が生成されるステップは、文法規則によって経路を表現する文字列が生成される過程とみなすことができる。

■ DNA 分子の反応

以上のような計算モデルを実現するためには、情報(データや計算の状態)を DNA 分子によって表現し、情報の変換を DNA 分子の反応によって実現しなければならない。情報を表現するには、DNA の塩基配列、DNA 分子が水素結合によって形成する二次構造などが用いられる。したがって、表現された情報を変化させるには、塩基配列を編集したり、二次構造を変化させる反応が用いられる。

○会合 (ハイブリダイゼーション)

互いに相補的な一本鎖が二本鎖を形成する反応。

○乖離

会合と逆に二本鎖が二本の一本鎖に分かれる反応。

○制限酵素による切断

個々の制限酵素によって定まった認識配列の切断部位にしたがって、二本鎖の DNA を切断する。二本鎖のうち片方の一本鎖のみを切断して切れ目(ニック)を入れる制限酵素もある。

○ライゲーション (ライゲースによる結合)

二本鎖の切れ目(ニック)において共有結合を形成する反応。

○ポリメラーゼによる伸長

二本鎖の片方の 3'末端を、もう片方を鋳型として伸長する反応。

○鎖置換 (ブランチャマイグレーション)

二本鎖の片方が入れ替わる反応。

DNA の反応

DNA の反応に触発された計算モデル

普遍的な計算モデル

ここにあげた普遍的な計算モデルは、すべて、DNA コンピューティングにより実現が試みられている。

会合

会合と乖離はほとんどのモデルにおいて活用されているので明示しない。

乖離

ライゲースによる結合

DNA Automaton
DNA の制限酵素による切断を巧みに利用して有限オートマトンを実現する計算モデル。

ポリメラーゼによる伸長

PEN Toolbox
DNA のポリメラーゼによる伸長とニックング酵素による切断を利用した増幅系に基づく計算モデル。複数状態安定スイッチやオシレーターなどを実装することが可能であり、たとえば有限オートマトン実装することが可能である。

制限酵素による切断

DSD (DNA Strand Displacement)
DNA の鎖置換 (strand displacement) に基づく計算モデル。短い toe-hold が自発的に乖離することを利用している。原理的には、任意の CRN を実装することが可能である。

鎖置換

グラフ上の経路の生成
Adleman のハミルトン経路問題の解法の最初のステップにおいて、グラフ上の経路が網羅的に生成されている。限定された文法による文字列の生成とみなすことができる。

Splicing System
制限酵素とライゲースによる二本鎖 DNA の組み替えに基づく計算モデル。

aTAM・kTAM
DNA タイルを想定したタイルアセンブリの計算モデル。

Seesaw Gate
DNA の鎖置換を利用したシーソーゲート (seesaw gate) による計算モデル。論理回路・ニューラルネットワークなど、多くの計算モデルを実装することができる。

論理回路
AND ゲート、OR ゲート、NOT ゲートなどの論理ゲートを用いて、ブール関数を計算するための最も基本的な計算モデル。

チューリング機械
無限長のテープと、その上の文字を読み書きするヘッドを制御する有限状態制御部から成る計算モデル。チューリング機械を実現できれば、任意の計算可能関数を計算することができる。

有限オートマトン
テープを有限とし、ヘッドを読み込み専用とし、ヘッドの動く方向を一方に制限したチューリング機械。逐次的な入力(入力文字列)によって現在の状態を逐次的に変化させる最も基本的な形式機械である。

レジスタマシン
有限オートマトンに、非負整数を格納することが可能なレジスタを追加した形式機械。レジスタが三つ以上あれば、チューリング機械と同等の計算能力を有する。

マルチセット書き換え
ポピュレーションプロトコルを一般化した計算モデル。あらかじめ用意された書き換え規則によって、マルチセット(多重集合)が書き換えられる。並列・分散計算のモデルあるポピュレーションプロトコルは、マルチセット書き換えの特殊な場合と考えられる。また、空間が膜によって区切られ、膜内でマルチセットが書き換えられる計算モデル (P-system) をはじめ、マルチセット書き換えを拡張した計算モデルは数多く提案されている。

CRN (Chemical Reaction Network)
マルチセットの要素を分子とみなし、書き換え規則に反応速度を割り当てたモデル。

セルオートマトン
有限オートマトンが空間の格子状に並んだもので、隣接するオートマトンの状態が各オートマトンへの入力となり、オートマトンの全体が同期して状態を遷移させる。

生成文法
文法規則によって文字列を生成する計算モデルである。正則言語、文脈自由文法、文脈依存文法など、文法規則の形によって階層的なモデルが定義される。

タイルアセンブリ
文字列ではなく、二次元や三次元の構造の形成するための計算モデル。あらかじめ定義された規則によって結合する複数種類のタイルが集合することによって、二次元や三次元の構造が形成される。

ニューラルネットワーク
脳神経系のニューロンのネットワークを真似た計算モデル。各ニューロンには、複数のニューロンの出力(一般には非負実数)が入力として与えられる。入力の重み付き線形和の関数(たとえばジグモイド関数や閾値を持つ階段関数)によって出力が定義される。このようなニューロンのネットワークによって、パターン認識や分類などの高度な情報処理を行うことができる。

萩谷昌己 (東京大学)

29. DNA 論理ゲート

DNA 分子によって論理回路を実装する試みは数多く行われている。論理回路の基本概念についてまとめた後、分子による実現に関する一般原理について述べた後、具体的な試みとして Seelig の酵素フリーロジックと Genot たちの可逆論理回路を紹介する。

■ 論理回路

論理回路は、最も基本的な計算モデルの一つである。なぜ論理回路が最も基本的な計算モデルか。そもそも、ビットは最も基本的なデータであろう。したがって、ビットが何個か並んだビット列も基本的なデータである。そして、ビット列を入力としてビットを出力する関数（ブール関数）は、最も基本的な計算と考えられる。そして、そのような関数を実装する仕組みが論理回路である。なお、このような論理回路は特に組み合わせ回路と呼ばれ、この他にメモリ（記憶）を持った論理回路である順序回路があるが、ここでは、組み合わせ回路のみを扱う。

数学的には、論理回路とは巡回路を持たない有向グラフである。一般に、有向グラフのノードに入ってくる有向辺の数をそのノードの入次数といい、出て行く有向辺の数を出次数という。論理回路の場合、ノードは、入力ノードと論理ゲートに分類される。入力ノードの入次数は 0 である。論理ゲートとして、通常は、AND と OR と NOT が用いられる。AND と OR の入次数は 2、NOT の入次数は 1 である。論理ゲートのうちのひとつが出力ノードと定義される。入力ノードから出力ノードまでのパスの最大長を、論理回路の深さという。

計算モデルとしての論理回路は計算量の観点から活発に解析されて来た。たとえば、NC と呼ばれる計算量のクラスが定義されている。 n ビットの入力を持つブール関数の族が NC に属するとは、それを実装する論理回路の族で、ゲートの数は n の多項式、回路の深さが $\log n$ の多項式となるものが存在することをいう。ただし、計算資源の制限されたチューリング機械が存在して、 n を入力として、 n ビットを入力とする論理回路（の表現）を出力する。

■ 分子による実現

以上に述べたように、論理回路は最も基本的な計算モデルであり、分子反応によって論理回路を実現することは、分子による計算の可能性を研究する上で、最も基本的なテーマとなる。したがって、多くの研究者によって論理回路を分子反応、特に DNA 分子の反応によって実現しようとする試みが活発に行われて来た。

分子反応によって論理回路を計算するには、まず、0 と 1 のビットをどのように表現するかを定めなければならない。一般に、電圧、光の強弱・波長、磁界の方向、温度など、ビットを物理現象によって表現する方法は多種多様であるが、各々のゲートの出力が他のゲートの入力となり、分子反応によって連鎖的にゲートの計算が行われるためには、各ゲートに分子種を対応させる必要がある。

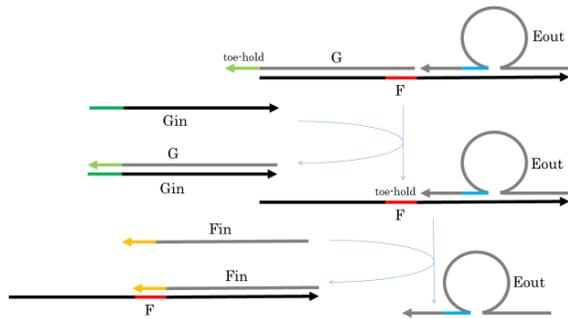
したがって、最も基本的な方法は、各ゲートに異なる分子種を割り当てる。たとえば、ゲート g に分子種 G を割り当てる。そして、ゲート g の出力が 0 の場合、分子種 G の分子は存在せず（濃度は 0 であり）、 g の出力が 1 の場合、 G 分子は存在（濃度がある閾値以上）と定義する。究極的には、出力を 1 とするには分子は 1 個あればよいが、現実的には、濃度の閾値を定義して、 G の濃度が閾値以上であるときに出力が 1 であると定義する。出力が 0 である場合は、濃度は限りなく 0 に近くあって欲しい。以上の表現方法を、以下の dual rail 表現 との対比で single rail 表現 と呼ぶことにする。

いわゆる dual rail 表現 では、各ゲート g に二種類の分子種 G と H を対応させる。 g の出力が 1 であることは、 G 分子が存在（濃度がある量以上）であることによって表現し、 g の出力が 0 であることは、 H 分

子が存在 (濃度がある量以上) であることによって表現する。

■ Seelig の酵素フリーロジック

まず, Seelig たちによる酵素フリー (酵素無し) の論理ゲートについて紹介する。

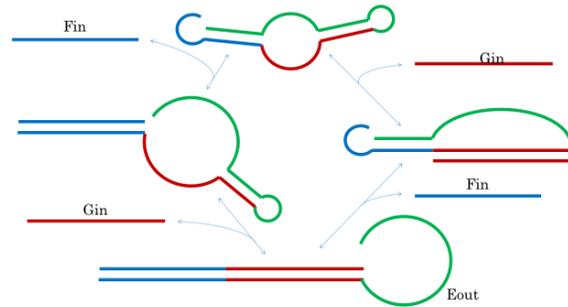


上図では AND ゲートが実装されている. Gin と Fin が入力である. まず, Gin がゲート内の一本鎖 G と toe-hold を介して結合した後, 鎖置換反応によって, Gin と G が二本鎖を形成する. すると, 新たに露出した toe-hold に Fin が結合して, 鎖置換反応により F と Fin が二本鎖を形成する. 以上のように, 入力 Gin と Fin の両方が存在すると, 出力である Eout が一本鎖となって乖離する.

一本鎖 DNA (もしくは一本鎖部分を持つ DNA 分子) がビットを表し, これらの存在の組み合わせによって, 新たな一本鎖 DNA が生成されることによってゲートが計算される. 鎖置換によって安定な二本鎖が生成される反応は非可逆であり, 一方向にのみ進む. したがって, この方式では, ある分子種の非存在によって反応を進めることはできないので, single rail 表現の場合, NOT ゲートを実装することができない. NOT がある場合には, 必然的に dual rail 表現を取らざるを得ない.

■ Genot たちの可逆論理回路

Genot たちは下図のように可逆な論理ゲートを実装している. この図でも AND ゲートが実装されている.



二つの入力 Fin と Gin によって, AND ゲートの形態が変化して行き, 両方の入力揃ったときのみ, 出力である一本鎖部分 Eout が露出する. 各反応は, 反応速度の違いはあるが, 両方向に進むことができるので, 入力的一方を取り除くと, 可逆的に反応が進み, 出力が消滅する.

したがって, single rail 表現においても, NOT ゲートを実現することができる. NOT ゲートに対応する一本鎖 G は, あらかじめ系に入れておく. NOT ゲートの入力, G と相補的な一本鎖とする. 相補鎖が入力されると, G と二本鎖を形成して G を系から取り除くので, G が否定されたことになる. G がなくなると, それにしたがって後段のゲートの反応が可逆的に進むために, 論理回路の計算が正しく行われる.

参考文献

- [1] [Seelig 2006] Seelig, G., Soloveichik, D., Zhang, D.Y., and Winfree, E., Enzyme-Free Nucleic Acid Logic Circuits, Science 314(5805):1585–1588, 2006.
- [2] [Genot 2011] A. J. Genot, J. Bath, and A. J. Turberfield, Reversible Logic Circuits Made of DNA. J. Am. Chem. Soc., 133(50):20080–20083, 2011.

30. DNAzyme 論理ゲート

DNA の中には酵素のような機能を持つ特別な配列があり、DNAzyme と呼ばれる。中でも金属イオンによりリボヌクレオチドのバックボーンを分解する DNAzyme を説明する。さらに DNA の組み合わせにより論理ゲートを構成した応用例を紹介する。

■ 金属イオンにより活性を持つ DNAzyme

特別な配列な配列を持つ DNA は酵素のような活性を持ち、一般に DNAzyme と呼ばれる。ここでは金属イオンによりエンドヌクレアーゼ活性を持つ DNAzyme を紹介する。

Mg²⁺により活性を持つ DNAzyme の概念図を図 1 に示す[1]。赤い矢印が DNAzyme を、青い矢印が基質の分子を表す。青い分子は DNA と RNA のキメラであり、DNAzyme により分解される部分のバックボーンはリボースになっている。さらに反応の進行を検出するために、各末端に蛍光と消光分子が修飾されている。初期状態では FRET により蛍光は抑制されている(☞ 51)。

Mg²⁺を加えることにより、青色の基質分子のバックボーンが分解される。結果的に蛍光と消光分子の距離が離れ、FRET が解消されることで蛍光する。重要な部分は、赤い DNA 右側の膨らんでいる活性部位である。一方で赤い DNA と青い基質はハイブリダイゼーションにより結合しているが、その部分の配列を変更しても一般に活性は保たれる。

分解活性を持つ DNAzyme には Mg²⁺で活性を持つ配列以外にも、Zn²⁺や Pb²⁺により活性を持つ配列が知られている[2]。また分解活性以外にも、バックボーンを接続するリガーゼ活性を持つ配列などが報告されている[3]。

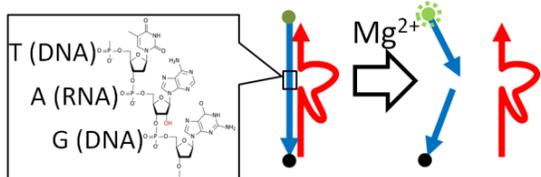


図 1 DNAzyme の概念図

■ DNAzyme を活用したシステム

DNAzyme は金属イオンの存在を検出するシステムとして利用できるだけでなく、DNA を入力とする複雑なシステムへと応用が可能である。特徴的な例がウォーカーと論理ゲートの構築である。ウォーカーでは、DNAzyme による分解反応が連続して起こり、次第に分解する位置が移動するというシステムである[4](☞ 25)。

DNA 論理ゲートは、望み通りのハイブリダイゼーションが起きた場合にのみ基質が切断されるシステムを作ることで実現されている[1]。図 2 は AND ゲートであり、最初の状態では赤い DNA の上下の部分は、ヘアピン構造により基質がどちらにもハイブリダイゼーションできない。入力によりヘアピン構

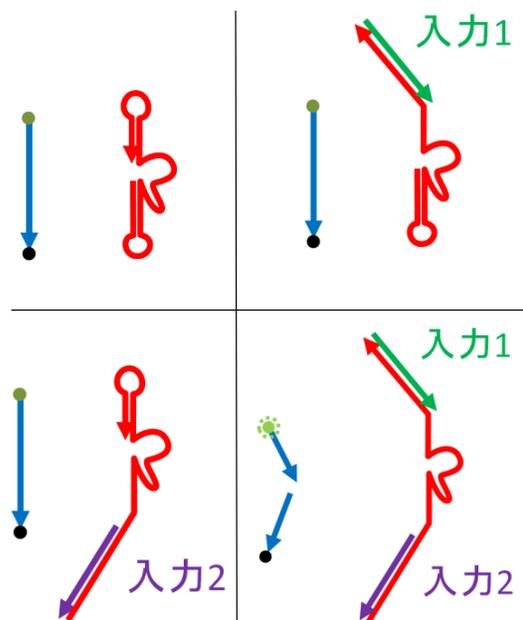


図 2 DNAzyme を使った AND ゲート

造が開かれるが、一方だけでは基質を切断するには至らない。両方の入力がある初めて、基質が切断され、出力として蛍光を測定できる。

さらに活性部位にヘアピンを同様に入れることにより、最初は活性があるが、入力が来ると失活するような仕組みも実現できる。[1]の論文では、AND 以外にも *D*(非含意)や XNOR が報告されている。

このような DNAzyme を使った論理ゲートを多段階にカスケードする研究も進んでいる[5]。システムの概要を図 3 に示す。切断された DNA が次の切断反応を活性あるいは失活させることで、正しい入力の組み合わせを与えた場合だけ蛍光が出力される系になっている。

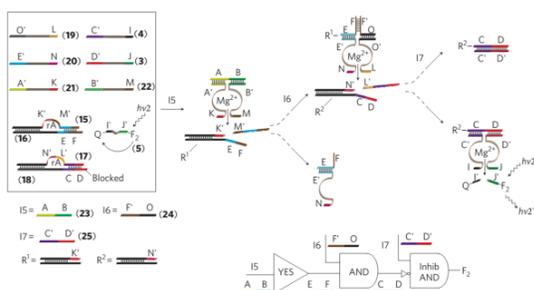


図 3 多段階の DNAzyme 論理ゲート[5]。

Reprinted with permission from nature publishing group, 2010

■ 3 目並べとディスプレイ

DNAzyme による論理ゲートを組み合わせることで、大規模なシステムを実装した例が報告されている。一つは 3 目並べを行うシステムである[6](図 4 左)。実際にマス目があるわけではないが、マス目に対応するチューブがあり、人間側は位置に対応する DNA

をすべてのチューブにピペッティングして入力を行う。システム側はマス目に対応するチューブから蛍光が出力される。ピペッティングと蛍光の読み出しを繰り返すことでゲームが進むが、システム側は負けないようにプログラムされている。

もう一つのシステムはディスプレイである[7](図 4 右)。入力の組み合わせにより、進数の変換や四則演算を行った結果が、空間的に配置されたウェルにより 1 から 9 までのデジタル数字として出力される。

参考文献

- [1] Milan N. Stojanovic, Tiffany Elizabeth Mitchell, Darko Stefanovic: "Deoxyribozyme-Based Logic Gates", *Journal of the American Chemical Society*, 124, 3555--3561, 2002
- [2] Itamar Willner, Bella Shlyahovsky, Maya Zayats, Bilha Willner: "DNAzymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications", *Chemical Society Reviews*, 37, 1153--1165, 2008
- [3] Bernard Cuenoud, Jack W. Szostak: "A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity", *Nature*, 375, 611--614, 1995
- [4] Ye Tian, Yu He, Yi Chen, Peng Yin, Chengde Mao: "A DNAzyme That Walks Processively and Autonomously along a One-Dimensional Track", *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 4355--4358, 2005
- [5] Johann Elbaz, Oleg Lioubashevski, Fuan Wang, Françoise Remacle, Raphael D. Levine, Itamar Willner: "DNA computing circuits using libraries of DNAzyme subunits", *Nature Nanotechnology*, 5, 417--422, 2010
- [6] Joanne Macdonald, Yang Li, Marko Sutovic, Harvey Lederman, Kiran Pendri, Wanhong Lu, Benjamin L. Andrews, Darko Stefanovic, Milan N. Stojanovic: "Medium Scale Integration of Molecular Logic Gates in an Automaton", *Nano Letters*, 6, 2598--2603, 2006
- [7] Julia E. Poje, Tamara Kastratovic, Andrew R. Macdonald, Ana C. Guillermo, Steven E. Troetti, Omar J. Jabado, M. Leigh Fanning, Darko Stefanovic, Joanne Macdonald: "Visual Displays that Directly Interface and Provide Read-Outs of Molecular States via Molecular Graphics Processing Units", *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 9222--9225, 2014

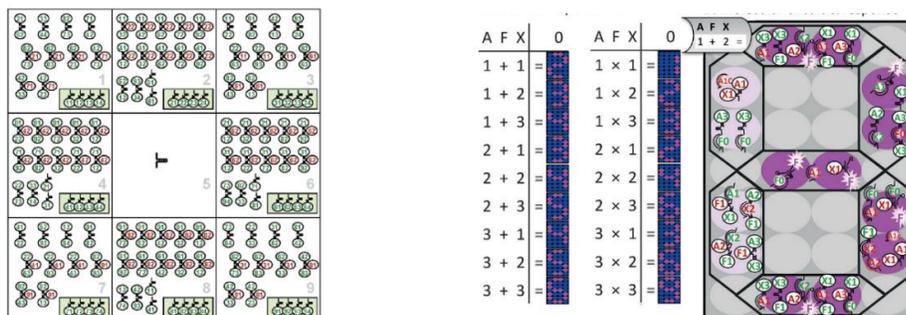


図 4 DNAzyme による 3 目並べ[6]とディスプレイ[7]。 Reprinted with permission from American Chemical Society, 2006 and Angewandte Chemie International Edition, 2014

31. エントロピー駆動ゲート

DNA の鎖置換反応を使ったシステムの例として、エントロピー駆動ゲートを紹介する。入力 DNA を触媒として使うことで増幅反応が進行し、出力 DNA が得られる。反応の前後で自由エネルギーを比較すると、エンタルピーの項よりエントロピーの項により反応を駆動している系になっている。

■ 鎖置換反応を使ったゲート

濃度の低い DNA を入力として、濃度の高い DNA を出力するには、何らかの増幅機構が必要である。ここでは酵素を使わず鎖置換反応(☞ 42)だけで進行する増幅ゲート[1]を紹介する。

反応機構の概要を図 1 に示す。矢印は一本鎖 DNA を、アルファベットは塩基のまとまりを表す。大文字と小文字は互いに相補な配列である。反応は左上から始まり、左回りに順に進行する。素反応としては、二重らせんを形成する Hybridization, 水素結合の交換を行う Branch migration, 解離である Denaturation の 3 種類が用いられている。

ゲートは 3 本の DNA が結合した Substrate(左上)と燃料分子である Fuel(右下)からなる。入力である Catalyst(上)がない状態では反応が進行せず、出力分子である Output(右)は Substrate に結合したままで

ある。

ここに入力である Catalyst が存在すると、E で表されるドメインに Hybridization を行い、反応が開始する。Branch migration と Denaturation が続き、Signal(左)分子が放出され、Intermediate 1(下)で表される状態になる。ドメイン C が一本鎖の状態なので、Fuel 分子が Hybridization することができ、続く Branch migration により Intermediate 2(中央やや右)の構造になり、Output 分子を出力する。さらに Denaturation の反応が進むことで、Catalyst が放出され、紫色と青色で表される DNA はこれ以上反応できない Waste(右上)になる。

ここで Catalyst は反応の前後で変化せず、触媒として機能している。反応後に放出され、別なサイクルを回すことが可能であり、Substrate がある限り繰り返し利用される。

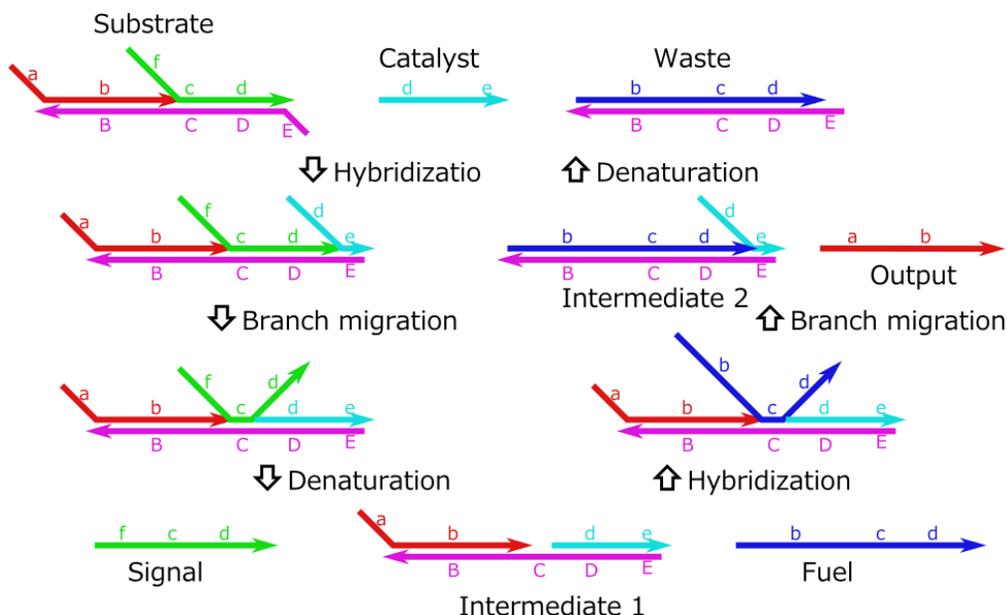


図 1 エントロピー駆動ゲートの反応機構

■ 実験による増幅反応の確認

出力された Output を FRET(☞ 51)により読み出した結果は図 2 のようなものになる。横軸は時間であり、縦軸は蛍光強度を正規化した値である。蛍光強度が大きいほど、出力の濃度が大きいことを表し、すべての出力が出た場合に 1 になる。図が直接表しているのは、化学反応モデル[2]から得られる微分方程式を数値解析(☞ 60,67)したシミュレーション結果である。右にある数字は、Input の DNA を Substrate に対してどれだけを加えたかを表す割合(等量比)である。

グラフから分かるように入力濃度以上に出力の濃度があり、増幅が行われている。例えば 0.1x で表される線は、2 時間後に 0.5 を超えている。これは 10% の入力から 50% 以上の出力を得ており、1 つの入力が平均 5 回以上サイクルを回したことを意味している。

論文の中ではゲートを二段に連結させたシステムや、Output を Input と同じ配列にした自己触媒反応が報告されている。二段に連結させたシステムの実験結果やモデルの解析によれば、12 時間反応させることで、濃度比で 0.01% の入力分子が存在するか・しないかを判別するシステムになるそうだ。ただし自己触媒反応に関しては出力が指数関数的に増幅できる一方、入力がなくても出力が漏れ出てしまうリーク反応が無視できない問題がある。

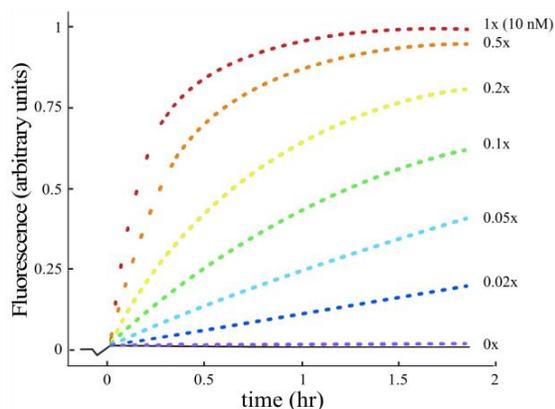


図 2 エントロピー駆動ゲートのシミュレート結果[1]
([1]を参考に図を作成)

■ エントロピー

図 1 の触媒増幅反応は何かからエネルギーを得て駆動しているだろう。ここで反応の前後にだけ注目した図 3 を考える。反応前は Substrate と Fuel の 2 つ分子があり、Catalyst を加えると反応が進み、反応後に Waste, Signal, Output の 3 つの分子になる。

ハイブリダイゼーションしているドメインに着目すると、反応の前も後も B, C, D のドメインがすべて結合している。つまり反応の前後で水素結合の個数は変わらない。水素結合の個数は自由エネルギー(☞ 38)のエントロピーの項(☞ 37)に影響を与えるが、この反応では大きな影響を与えないことが分かる。

反応の前後で変化したのは分子の個数であり、先にも述べた通り、2 分子から 3 分子に増えている。分子の自由度は相対的に大きくなり、配置エントロピー(☞ 37)が増大する。エントロピーにより駆動していることを示すために、論文では Fuel を短くした実験を行っている。

エントロピーにより駆動されるシステムなので、DNA のハイブリダイゼーションに影響を与える温度や塩濃度に対してロバストな反応であり、増幅以外にも利用価値があるシステムと言える。

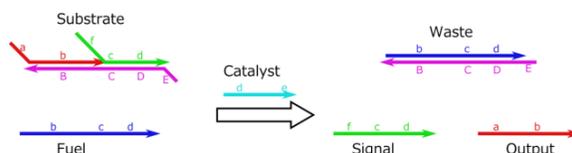


図 3 反応の前後だけに注目

参考文献

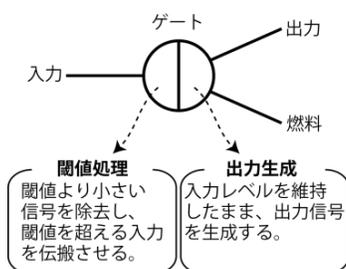
- [1] David Yu Zhang, Andrew J. Turberfield, Bernard Yurke, Erik Winfree: "Engineering Entropy-Driven Reactions and Networks Catalyzed by DNA", Science, 318, 1121-1125, 2007
- [2] Andrew Phillips, Luca Cardelli: "A programming language for composable DNA circuits", Journal of the Royal Society Interface, 6 Suppl 4, S419-S436, 2009

32. シーソーゲート

DNA の鎖置換反応(☞ 42)を巧みに利用したシーソーゲート (Seesaw gate) と呼ばれる DNA 分子反応を紹介する。最も重要な点は、回路設計においてシーソーゲートを基本ゲートとし、適切に組み合わせることで論理回路、リレー、アナログ回路が実現できることである。

■ 基本素子としてのシーソーゲート (基本動作)

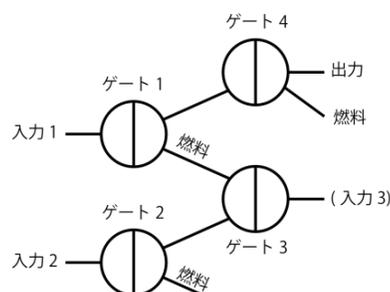
次図に示すような演算素子を考えてみよう。素子の入力信号は、予め設定された閾値と比べられ、閾値より小さな信号はノイズとして除去される。あるいは、閾値を超える入力に対しては、出力信号が生成されるというものである。ただし、出力生成には燃料が必要であるとする。後に説明するように、シーソーゲートとは、この演算素子を DNA 分子反応で実現したものである。



■ 組み合わせで AND ゲートができる

つぎに次図を見てほしい。4 つの基本素子を組み合わせたものであり、AND ゲートを実現している。いま、入力 1 の信号レベルが閾値を超えているケースを考える (以後、簡単に入力が閾値を超えている状況を ON, そうでないときを OFF と呼ぶことにする)。ここで、入力 3 は補助的な入力であり、常に ON であるとする。入力 1 は ON であるが、ゲート 1 から出力が生成されるためには、燃料が必要となる。この燃料は、ゲート 3 からの出力として供給されるが、ゲート 3 から出力が作られるためには、やはりゲート 3 への燃料が必要となる。もし、入力 2 が ON のときは、ゲート 2 からゲート 3 の燃料となる出力が作られる。従って、入力 1 と入力 2 が ON のときのみ、ゲート 1 から出力が生成されることになり、入力のいずれか、あるいは双方が OFF のときは、ゲート 1 からは出力が生成されない…つまり AND ゲー

トとして動作する。ゲート 4 は AND ゲートの信頼性を高めるために挿入されている。Qian らは、文献 [1]において、その他にも OR ゲート、ブーリアンネットワーク、コンパレータ、リレー、アナログ回路を構築しており、DNA 分子反応による回路設計の可能性の扉を大きく開いた。このように、シーソーゲートを巧みに組み合わせると、かつ、回路の動作の信頼性を高める工夫を施すことで、様々な回路を構築することができるのが最大の魅力と言える。

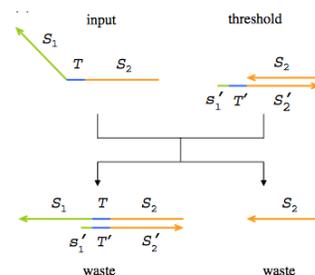


■ シーソーゲートを構成する DNA 分子反応

シーソーゲートの機能と魅力が分かったところで、具体的な DNA 分子反応について説明しよう。

1) 閾値処理

入力分子は、配列 S_1 - T - S_2 を持つ 1 本鎖 DNA であり、閾値を決める分子は、足がかり配列 T' を含む 2 本鎖 DNA である(☞ 42)。入力 DNA と

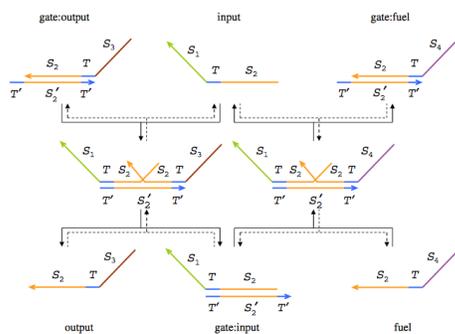


Reprinted from the Journal of the Royal Society Interface, 2011 [4] (Open access)

閾値 DNA が会おうと足がかり配列を起点として鎖の交換が行われ、1本鎖としての入力 DNA は消失する。従って、ゲート内での演算を進めるためには、閾値 DNA の濃度を超える入力 DNA の存在が必要となる。

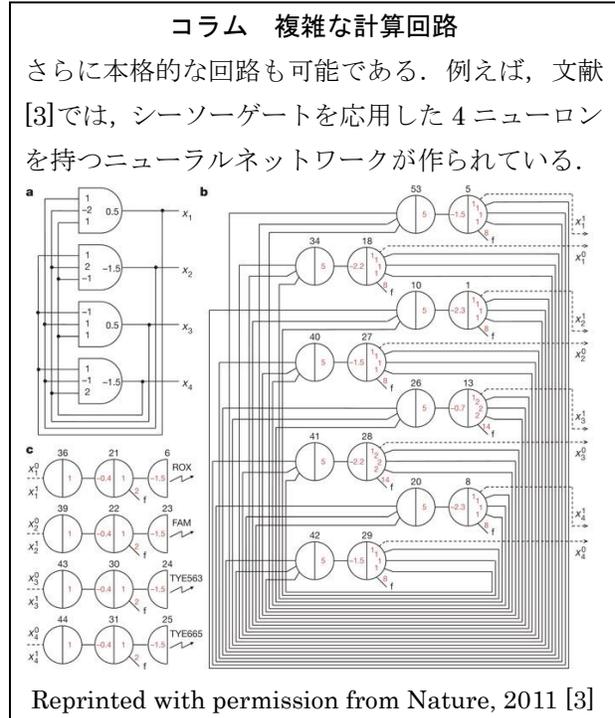
2) 出力生成

次図はシーソーゲートの名前の由来となっている鎖置換反応の連鎖反応である。図において、実線で示される反応が支配的であり、点線の反応は逆反応である。まず、入力 DNA (input) が、ゲート内部に存在する 2 本鎖 DNA (gate:output) と会おうと、鎖置換反応により出力の 1 本差 DNA (output) と 2 本差 DNA (gate:input) に置き換わる。gate:input は、燃料 DNA (fuel) が結合するための足がかり配列 T' を露呈するため、今度は fuel と gate:input の間で鎖置換反応が生じ、input と 2 本差 DNA (gate:fuel) に変換される。前半の鎖置換反応は、図の上から下への物質の流れであり、後半は下から上…と“シーソー”のような反応のサイクルが現れる。特に重要な点は、前半の鎖置換反応で消費された input が、後半の鎖置換反応で補充されるという点である。一般に、回路設計では、回路単体では正常に動作するが複数種類の回路を接続し、組み合わせると正しく動作しない…という状況は避けなければならない。このような、回路単体の動作が接続によって影響を受けない性質をモジュール性と呼ぶ[2]。



Reprinted from the Journal of the Royal Society Interface, 2011 [4] (Open access)

シーソーゲートは、反応サイクルにおいて、入力 DNA を著しく消費すること無く、出力 DNA を生成するため、モジュール性に優れている。例えば、文献[1]では、構築された論理ゲートを組み合わせて、さらに大規模な回路としてのコンパレータを実現している。



参考文献

- [1] L. Qian, E. Winfree, A Simple DNA Gate Motif for Synthesizing Large-Scale Circuits, DNA Computing, pp. 70-89, 2009.
- [2] D. D. Veccchio, R. M. Murray, Biomolecular Feedback Systems, Princeton University Press, 2015.
- [3] L. Qian, E. Winfree, J. Bruck, Neural network computation with DNA strand displacement cascades, Nature, Vol. 475, pp. 368-372, 2011.
- [4] L. Qian, E. Winfree, A simple DNA gate motif for synthesizing large-scale circuits, Journal of the Royal Society Interface, Vol. 8, 2011.

33. DNA toolbox

既存の DNA 計算とは異なり、Montagne らによって開発された DNA toolbox は DNA 同士の反応と酵素反応の両方を組み合わせた枠組みである。二つの反応を組み合わせることによって、ユニークな能力を持った動的平衡なシステムを設計することができる。

■ 遺伝子制御ネットワークを模倣する

生物の細胞では、遺伝子である DNA を mRNA に転写し、それをタンパク質に翻訳するという多段階の複雑な情報処理が起こっている。そこでできたタンパク質は、今度は他の遺伝子を活性化したり、あるいは逆に抑制したりする。複数の遺伝子が相互に複雑に影響しあうことで、遺伝子制御ネットワーク (Gene Regulatory Network: GRN) と呼ばれるシステムになる。

振動[1]や記憶[2]などの GRN の複雑な振る舞いを工学的に作成し観察することができる。しかしながら、DNA→RNA→タンパク質という一連のプロセスがあるので、反応が遅かったり調整が難しくかったりする。Montagne らは DNA と酵素を組み合わせ、同じような複雑なシステムを構築する以下の戦略を思いついた[3]。

- 25 塩基程度のテンプレートと呼ばれる“長い” DNA が遺伝子として働き、酵素反応によって短い DNA を合成する。
- 短いシグナル DNA はターゲットとなるテンプレートにハイブリダイゼーションし、その働きを活性、あるいは抑制する。
- エキソヌクレアーゼによってシグナル DNA は常に分解され、システムは動的であり続ける。

■ テンプレート DNA に作用する

テンプレート DNA は入力と出力の二つの領域から成り、DNA toolbox の中心的な役割を担う。入力領域に相補なシグナル DNA が結合すると、ポリメラーゼによって伸長される。結果的にテンプレート DNA は完全二本鎖になる。入力と出力の両方を離すために、テンプレート DNA はニッカーゼの認識配列を持つ。ニッカーゼによって入力と出力は分離され、解離する(図 1)。

テンプレートから解離した出力は、シグナル

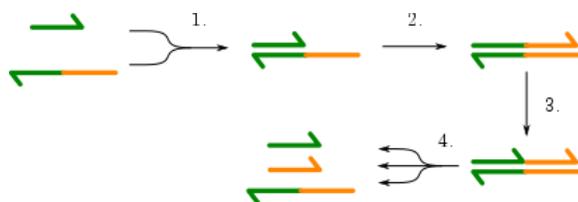


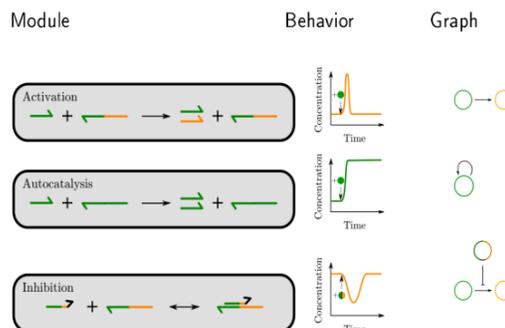
図 1: テンプレートの働き。1. ハイブリダイゼーション 2. 伸長反応 3. 分離 4. 解離

DNA になるという点は、DNA toolbox の重要な性質である。シグナル DNA を介してテンプレート DNA 同士をリンクすることで、GRN のようなシステムを構築することが可能である。

前の節で述べたように、エキソヌクレアーゼによって一本鎖のシグナル DNA は分解される。一方テンプレート DNA については、バックボーンの 5' 末端を修飾して保護することで、そのような分解反応の影響を受けないようにする。

■ DNA toolbox におけるモジュール

DNA toolbox には、活性化、自己触媒(自己活性)、抑制の 3 つの主要モジュールがある。それぞれの働き、振る舞い、グラフ表現を図 2 に示す。モジュールのグラフ表現では、丸いノードがシグナルを、通常の矢印がテンプレートを、T 字型の矢印が抑制を表す。



Montagne et al. 2011

図 2: DNA toolbox のモジュール

抑制を行う三つめのモジュールは、inhibitor と呼ばれる種類のシグナル DNA によって働く。Inhibitor は対象のテンプレートの多くの部分に結合するが、ポリメラーゼやニッカーゼの反応を起こさない(それぞれ、配列のミスマッチ、不完全な認識配列が原因)。つまり、inhibitor が解離するまでは、テンプレートの働きを失活させる。Inhibitor が入力 DNA としては使用できないことに注意する。

Montagne らは上記の枠組みを用い、図 3 の振動子を開発し[3]、Padirac らは二状態回路と二状態スイッチを開発した[4]。それらのシステムは実験によって実証された。理論的にはさらに複雑なシステムも提案されている[5]。

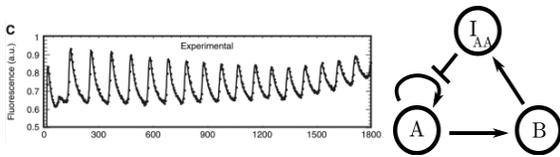


図 3: Montagne らの振動子と実験結果
Reprinted from Molecular Systems Biology, 2011 [3] (Open Access)

■ 単純なモデル

DNA toolbox は非線形な反応を含むので、システムがどのような振る舞いをするか完全に予測することは困難である。最低限の詳細化をする場合、テンプレートは図 4 のようにブラックボックスととらえる。ブラックボックスはミカエリスメンテンの反応速度に習った、単純な変換器である。このモデルはハイブリダイゼーションとディナチュレーション(それぞれ相補な DNA どうしの結合と解離)が酵素反応より十分速く平衡に達するという仮定を根拠としている。結果として、それぞれのモジュールについて、図 4b の数式が得られる。グラフ表現を元に、各シグナル DNA を使用するテンプレートの反応を足し合わせることで、システム全体を表す数式を容易に組み立てることができる。その際に、エキソヌクレアーゼによる分解を、図 4d の一次反応によって近似して加える。

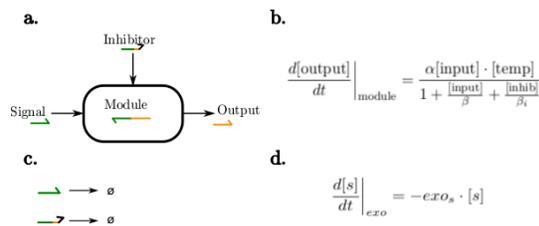


図 4: DNA toolbox のブラックボックスを使った表現と数式。縦棒は制限を、[]は濃度を、 α と β はパラメータを表す。Exo はエキソヌクレアーゼ反応である。

このような DNA toolbox のモデル化は、Padirac らによって初めて提案された[4]。数式が単純なので、大きなシステムのシミュレーションを極めて速く行うことができる。その性質は、数千回もの評価が必要な、複雑な DNA toolbox システムの進化において使用された。進化の過程では、興味深いパターンを持つシステムがアルゴリズムによって発見された[7]。

■ DACCAD による詳細なモデル

単純なモデルには、テンプレート DNA を陽に記述しないという大きな制約がある。シグナル DNA がテンプレート DNA に結合することで、エキソヌクレアーゼによる分解反応から守られることも考慮されていない。基質分子の濃度が不明なため、ポリメラーゼやニックアーゼの飽和も計算することができない。ハイブリダイゼーション-伸長-分離による時間の遅れも失われてしまっている。

それらの課題を扱うために Padirac らは、テンプレートのどの領域にシグナルがハイブリダイゼーションするかを追える、詳細なモデルを提案した[4]。そのモデルは Aubert らによってさらに改良された[5]。しかしながらモデル中では非常に多くの反応が組み合わせられるため、手書きでシミュレーションを行うことは不可能である。Aubert らはシミュレーションの工程を簡略化するために、グラフィカルなインターフェースを備えた DACCAD を発表した[5]。ソフトウェアはインターネットから無償で入手可能である。

■ 実験のための実装

いったんシステムが期待通りシミュレーションできたら、実際の DNA 配列を設計する段階に移る。この特定の作業については Baccouche らによって詳しく説明されている[6]。論文には実験を行うための基本的な手引きや、よく起こる問題に対する解決策が解説されている。

参考文献

- [1] Elowitz, M. B., & Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 403(6767), 335-338.
- [2] Gardner, T. S., Cantor, C. R., & Collins, J. J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 403(6767), 339-342.
- [3] Montagne, K., Plasson, R., Sakai, Y., Fujii, T., & Rondelez, Y. (2011). Programming an in vitro DNA oscillator using a molecular networking strategy. *Molecular systems biology*, 7(1).
- [4] Padirac, A., Fujii, T., & Rondelez, Y. (2012). Bottom-up construction of in vitro switchable memories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), E3212-E3220.
- [5] Aubert, N., Mosca, C., Fujii, T., Hagiya, M., & Rondelez, Y. (2014). Computer-assisted design for scaling up systems based on DNA reaction networks. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(93), 20131167.
- [6] Baccouche, A., Montagne, K., Padirac, A., Fujii, T., & Rondelez, Y. (2014). Dynamic DNA-toolbox reaction circuits: a walkthrough. *Methods*, 67(2), 234-249.
- [7] Aubert, Nathanaël, et al. (2013). Evolution of Cheating DNA-based Agents Playing the Game of Rock-Paper-Scissors. *Advances in Artificial Life, ECAL*. Vol. 12.

Nathanael Aubert-Kato (御茶ノ水女子大学)
訳 川又生吹 (東北大学)

34. DNA 状態機械

自律的に進行する一連の反応で多段階の演算を実行する自律型の DNA コンピューティングは、生物のように分子反応で高度な情報処理を行うための基礎技術になると期待される。内部状態を持つ DNA コンピュータを実装した2つの代表的な反応系について、その概要を解説する。

■ 第二世代の DNA コンピューティング

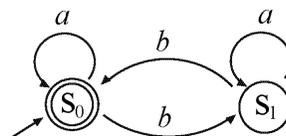
DNA の配列特異的なハイブリダイゼーションにもとづく反応は、文字列で符号化された規則に則った記号操作、すなわち「演算」を行っていると考えることができる。Adleman は、DNA の反応を利用して実際に数学的な問題が解けることを示した (☞ 36)。そこでは、DNA 分子を直線的に記号が並んだ“記録テープ”として扱い、人間が行う実験操作によって演算の各ステップを実行する。このようなタイプの DNA コンピューティングは“古典的”，もしくは“第一世代”と言われる。これに対し、溶液内で自律的に進行する一連の反応で多段階の演算を実行する“第二世代”の DNA コンピューティングは「分子プログラミング」とも呼ばれ、これまでにいくつかの演算モデルが提案されている。

DNA によるナノ構造が何らかの反応で多段階に変化するとき、各構造が演算における異なる「状態」を表していると考えられる。ある構造をとったときに特定の反応が起こって別の構造へと変化するならば、それはナノ構造が自らの内部状態を参照して演算を行っていると考えられる。近年、DNA 分子の鎖置換反応にもとづく DNA 論理ゲートが主に研究されているが (☞ 29)，ここでは酵素反応を利用して内部状態を持つ「状態機械」を実装した2つの反応系を紹介する。DNA コンピューティング分野の初期に提案された制限酵素を用いる有限オートマトンと、DNA ポリメラーゼによる伸長反応を繰り返して演算する状態機械についてみてみよう。

■ DNA オートマトン

「有限オートマトン (finite automaton: FA)」とは仮想的な演算モデルであり、内部状態と状態遷移関数を持っている。記号列が入力されるとそれを順番

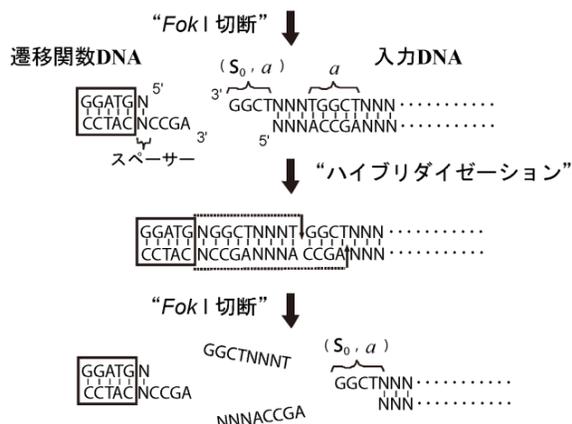
に読み取り、自らの状態を参照しながら状態遷移を実行していく。最終状態が受理状態であれば記号列が受理されたと言う。例えば下図の FA は、記号列「*baba*」が入力されるとまず左端の *b* を読み取り、状態遷移関数にしたがって初期状態 S_0 から S_1 へと遷移する。次に左から2番目の *a* を読み取って状態 S_1 から S_1 へ遷移する。さらに3番目の *b* を読み取って状態 S_1 から S_0 へと遷移し、4番目の *a* を読み取ると状態 S_0 から S_0 へと遷移する。この例では状態 S_0 が受理状態であり、FA は入力 *baba* を受理する。



偶数個の *b* を含む記号列を受理する FA. 丸囲みの記号が各状態を表し、二重丸は受理状態であることを表す。矢印とその上の記号で状態遷移関数を表す。

Shapiro たちは、DNA と IIs 型の制限酵素 *Fok I* を利用した反応系で FA を実装した [1]。II 型制限酵素は二本鎖 DNA の特定の配列を認識して、両方の DNA 鎖を特定の位置で切断する (☞ 47)。II 型制限酵素のうち IIs 型は、認識配列の外で DNA 鎖を切断する。次頁の図に示すように、入力記号列を符号化した「入力 DNA」の突出末端の配列に対し、相補的な配列の突出末端を持った「状態遷移関数 DNA」がハイブリダイゼーションすることで、*Fok I* が入力 DNA を切断する。これは記号を1つ読み取って状態遷移することに相当する。切断後は入力 DNA に新たな突出末端が生じ、次の記号を先ほどと同様に読み取って状態遷移を実行する。*Fok I* 認識配列のすぐ右側にある1~3塩基のスペーサ配列によって、複数の状態が巧みに符号化されている。紙面の都合で詳

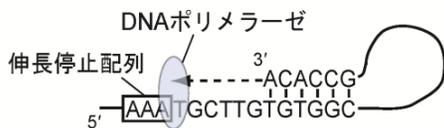
細は書き切れないので、元論文 [1] や日本語の解説 [2] を参照されたい。



DNA オートマトンの状態遷移反応. N は任意の塩基, 縦線で塩基対を表す. *FokI* 認識配列を四角で囲った. 文献[2] 93 ページ図 5.9 より転載.

■ Whiplash PCR

萩谷たちは, DNA の 3' 末端部分が分子内の相補配列と結合してプライマーとなり, DNA ポリメラーゼによる伸長反応が起こることを利用して, 多段階の状態遷移規則を 1 分子の DNA で符号化する状態機械を考案した [3]. 通常の DNA 伸長反応時には 4 種の塩基すべての dNTP を反応溶液に加えるが, 1 種だけ加えないでおくと, それと相補的な塩基の位置で伸長反応が停止する. この「伸長停止法 (polymerization stop)」によって, 各状態を符号化する塩基長ごとに伸長反応を行わせることができる.



伸長停止法. 反応溶液から dTTP を除いておくと, 鑄型 DNA の塩基 A の位置で伸長反応が停止する.

3' 末端部分の配列が状態機械の「現在の状態 (current state)」を表しており, 伸長反応で 3' 末端に新たな配列が付加されることが状態遷移に相当する. 付加された配列が, それと相補的な配列を持つ分子内の別の部分配列と新たに結合すると, さら

に次の状態遷移が起こり, 多段階の状態遷移を自律的に実行していく. その様子が鞭を打ち下ろすようであることから「鞭打ち PCR (Whiplash PCR)」と呼ばれている. この反応系は, DNA の相補配列間での結合が分子内反応であるため, 分子間のハイブリダイゼーションとは異なり反応速度が DNA の濃度に依存しない. 異なる配列を持った複数の状態機械が, 1 つの反応容器中で並列に多段階の演算を実行することができる. 小宮たちは, Adleman と同じ小規模なベンチマーク問題を, Whiplash PCR を利用して一定回数の実験操作で解けることを示した [4].

■ DNA 状態機械の課題

本稿で紹介した反応系で実用的な演算を行おうとすると, DNA オートマトンは符号化できる状態の個数が少ない点や, ハイブリダイゼーション速度が濃度に依存するために, どうやって多くのデータを迅速に処理するかといった点が課題となる. 一方, DNA の二次構造形成と融解を繰り返す Whiplash PCR は, 反応に高温条件を必要とする点や, どのように入力を行うかという点などが課題である. DNA コンピューティングで適応や学習などの高度な情報処理を実現するには, 内部状態を持つ演算機構は必須だろう. いろいろな演算モデルとそれを実装する反応系について大勢で議論して, 上記の課題を克服するような新しい反応系を提案することが望まれる.

参考文献

- [1] Y. Benenson, T. Paz-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh, E. Shapiro, Nature, 2001, 414, 430.
- [2] 小宮健, 瀧ノ上正浩, 田中文昭, 浜田省吾, 村田智, “DNA ナノエンジニアリング”, 近代科学社
- [3] M. Hagiya, M. Arita, D. Kiga, K. Sakamoto, S. Yokoyama, DIMACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science, 1999, 48, 57.
- [4] K. Komiya, K. Sakamoto, A. Kameda, M. Yamamoto, A. Ohuchi, D. Kiga, S. Yokoyama, M. Hagiya, BioSystems, 2006, 83, 18.

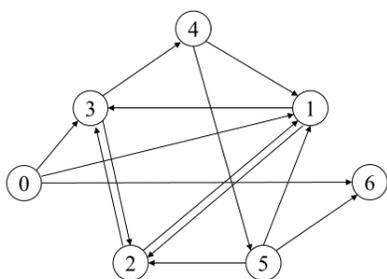
小宮 健 (東京工業大学)

35. 巡回セールスマン問題

Adleman による有向ハミルトン経路問題の DNA 分子を用いた解法について解説した後、巡回セールスマン問題についても説明し、探索から最適化と題して、in-vitro selection にも言及しながら、遺伝的アルゴリズムなどの進化計算について簡単に述べる。

■ Adleman のアイデアと実験

1994 年に計算機科学者の Adleman は、DNA を用いて、有向ハミルトン経路問題と呼ばれる数学問題を解くことに成功し、ここに DNA コンピューティングの研究分野が始まったと言っても過言ではない。



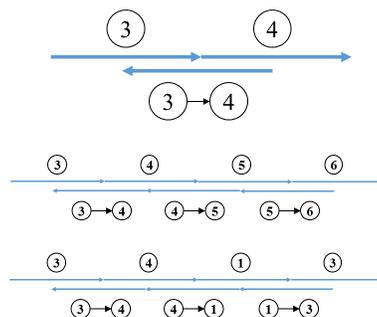
有向ハミルトン経路問題とは、図のような有向グラフ（辺に向きのあるグラフ）の指定されたスタートのノード（節点）から始まり、別に指定されたゴールのノードに至る経路で、すべてのノードをちょうど一回ずつ通るようなもの（これをハミルトン経路という）を探索する問題である。

一般に、膨大な数の解候補の中から解の条件を満たすものを探す問題は、NP 完全問題に分類されることが多い。NP 完全問題とは、直感的に説明すると、問題のサイズ（グラフに関する問題の場合はグラフのノードと辺の数）が大きくなるにつれ、解候補の数が指数的に爆発してしまい、解の探索が極めて困難になるような問題である。いうまでもなく有向ハミルトン経路問題は NP 完全問題である。

いわゆる古典的 DNA コンピューティングでは、探索問題を解くために、一つ一つの解候補を別々の配列を持つ DNA 分子によって表現することにより、解候補の全体を DNA 分子のライブラリとして生成する。すなわち、試験管の中に膨大な種類の DNA 分子

が混合しているライブラリを生成する。そして、そのようなライブラリ全体に対して、一連の選択操作を施して、問題の解の条件を満たす DNA 分子だけを取り出すことによって、探索問題を解く。

Adleman のアイデアでは、グラフの各ノードを、一本鎖の DNA 分子によって表現する。もちろん、異なるノードには別の配列を割り当てる。そして、ノードを結ぶ有向辺（たとえば③→④）は、その根元のノード（③）と矢先のノード（④）の配列を半分ずつ結合して、そのワトソン・クリック相補配列によって表現する。



ノードを表現する DNA 分子と有向辺を表現する DNA 分子を化学合成して、試験管の中でアニールすれば、図のように、グラフ上の経路に対応する二本鎖 DNA 分子が多数得られる。この過程は、グラフ上の経路をランダム（確率的）に生成することに相当する。なお、ライゲースを用いれば、隣り合う DNA 分子を共有結合で繋げることができる。

分子の数は十分に大きく、グラフ上の経路、特にハミルトン経路と同じ長さの経路（もしくはそれより短い経路）はすべて生成されるとしよう。すると、DNA 分子として生成されたグラフ上の経路の中から、解の条件を満たす経路（ハミルトン経路）を選び出せばよい。

Aldeman は、ハミルトン経路を選ぶために、PCR、電気泳動、磁気ビーズによる選別を用いた。まず、スタートとゴールを表現する DNA 分子をプライマとして PCR を行い、スタートからゴールに至る経路のみを選択し増幅する。次に電気泳動により、ハミルトン経路と同じ長さの経路のみを選択する。最後に磁気ビーズを用いて、スタートとゴール以外のすべてのノードを含む経路を選別する。

以上の操作は、試験管の中のすべての DNA 分子に対して一様に適用される。各 DNA 分子は、グラフ上の経路というデータを表現しているので、このような操作は、すべてのデータに対して一様に適用されるという意味で「データ並列」と呼ばれる。したがって、Adleman の方法はデータ並列操作による並列計算と考えることができる。

同様の方法により、他の NP 完全問題の解法が提案され、実際に DNA を用いた実験も数多く行われた。特にブール式の充足可能性問題は、NP 完全問題の中でも最も基本的なものであるが、Adleman 自身、Lipton、萩谷他によって、DNA 分子を用いた解法が提案され実験も行われた。

■ 探索から最適化へ

古典的 DNA コンピューティングでは、解候補を DNA 分子により確率的に生成する。この過程ですべての解候補を網羅することが期待されるが、問題のサイズが大きくなると、一分子が一候補を表現していても、すべての候補を網羅することはできなくなる。また、確率的な偏りにより、特定の候補のみが生成される場合もあり得る。

さらに、実世界の問題では、解の評価値が定義され、評価値が最大（もしくは最小）の解を求めたいことが多い。しかも、現実的には、評価値が最大（最小）でなくとも、なるべく大きい（小さい）ものを求めたいことがよくある。このような問題を一般に最適化問題と呼ぶ。

巡回セールスマン問題は最適化問題の典型例である。巡回セールスマン問題は有向ハミルトン経路問題に似ているが、グラフの辺には長さが指定されて

いる。また、単なる経路ではなく、スタートとゴールが一致している巡回路を探索する。すなわち、すべてのノードをちょうど一度ずつ通る巡回路で長さが最短ものを求める。最短の巡回路を求めるという問題は NP 完全であるが、この問題は、なるべく短い巡回路を求めるという最適化問題と考えることもできる。

巡回セールスマン問題も盛んに研究され、実に様々な解法が提案されており、各種の最適化手法のベンチマークともなっている。

最適化手法のうち、色々な問題に適用可能な汎用的な手法が提案され、メタヒューリスティクスと呼ばれている。主なメタヒューリスティクスとして、焼きなまし、ホップフィールドネットワーク、ボルツマンマシン、タブー探索、遺伝的アルゴリズム、群最適化、アントコロニー最適化、などがある。

このうち、遺伝的アルゴリズムは、多数の解候補の集団を人工進化させることにより、評価値の大きい（小さい）解候補を求める手法である。Adleman の方法では、解候補の生成が最初に一度行われるのみであるのに対して、遺伝的アルゴリズムでは変異や交叉によって新たな解候補が生成される。しかし、生成と選択という大枠は同じであり、変異や交叉の操作もデータ並列的に行うことが可能である。したがって、Adleman の方法を遺伝的アルゴリズムなどの進化計算に発展させることは自然である。

その一方で、DNA、RNA、タンパクなどのポリマー分子のライブラリに対して人工進化を行うことにより、特定の機能（たとえばターゲット分子に対する親和性）を持つ分子を探索する方法が確立されており、分子人工進化、in-vitro selection などと呼ばれている。これはまさに、分子に対する最適化問題を解く方法と考えることができる。

参考文献

[1] Adleman, L.M.: Molecular computation of solutions to combinatorial problems. Science Vol. 266, no.5187, pp. 1021-1024 (1994).

萩谷昌己（東京大学）



NanoQRcode 関西大学 2014 年

第 4 章

基礎知識（お勉強編）

36. 概論 どんな分野の勉強が必要か

生体分子システムのデザインを競う BIOMOD は、分子に関する化学や物理の知識のほか、プログラミングや機械工学に関連するスキルを身につけたり、生物学や情報科学の造詣を深めたりするチャンスだ。学科の壁を超えた分野融合チームを結成して、オリジナルな分子ロボットで世界に挑戦しよう。

■ 分子システムをデザインする

BIOMOD の正式名称は Biomolecular Design Competition であるが、ここでいうデザイン(設計)とは、“分子をデザインする”と言った場合の従来の意味とはややニュアンスが異なる。化学分野で分子のデザインと言えば「分子は化学構造ごとに固有の物性があり、望みの物性を示す化学構造をデザインする」といったニュアンスになるだろう。これに対して BIOMOD では、DNA のプログラマビリティに重きが置かれている。塩基配列が異なる DNA は分子としてはそれぞれ化学構造が異なるが、相補配列に対する各 DNA の結合特性などは、配列によらずほぼ一様と考えられる。そのため、塩基部分のちがいは物性というよりも、相互作用する相手とその度合いを決めるものであり、塩基配列によって多数の相互作用の組み合わせ方を決めて反応系全体の振る舞いをプログラムする、すなわち「分子からなるシステムの挙動をデザインする」といったニュアンスになる。では、分子システムをデザインするためにはどのような分野の知識が必要になるのだろうか？

■ 構造 DNA ナノテクノロジー

DNA のプログラマビリティに焦点を当てた研究分野は「DNA ナノテクノロジー」と呼ばれている。ここではまず、DNA が配列特異的にハイブリダイゼーションする性質を利用してナノ構造体を作成する研究が行われた [1]。このような研究は近年、「構造 DNA ナノテクノロジー (structural DNA nanotechnology)」と呼ばれており、化学者である Seeman が、DNA 分子が自身の部分配列と相補的な配列を持つ複数の DNA 分子と、交叉して結合することを発見したのがその端緒となっている。その後、情報科学

分野の研究者たちによってシステマチックな配列設計が行われるようになり、DNA オリガミなどのすぐれた技術が開発されてきた (☞ 18)。また、分子の規則的な自己会合はそれ自体が情報処理プロセスであり、現在の電子コンピュータとは異なる新しい演算モデルという観点からも研究が行われている。

■ 動的 DNA ナノテクノロジー

DNA によるナノ構造体の構造を変化させて、機械動作する DNA ナノマシンが構築できる (☞ 24)。ここでは、物理学者である Yurke たちが見出した DNA の鎖置換反応が基盤となっている [2]。また、同じ反応を利用して論理ゲートを構築する研究も発展してきている (☞ 29)。これらは「動的 DNA ナノテクノロジー (dynamical DNA nanotechnology)」と呼ばれており、そのようなシステムの動作を設計する上では熱力学の知識が求められる。特に関連が深いものについては本章で紹介する。また今後、ナノマシンが発生する力を計測する研究なども盛んになると思われるが、ここでは機械工学の知識が役に立つだろう。ただし、分子ナノマシンはこれまでのマクロなスケールのメカトロニクスとはサイズや原理が異なるため、機械系ではいわゆる四力(材料力学、流体力学、熱力学、機械力学)とともに、分子や溶液系といったソフトな材料を扱うための知識も身につけられると良い。

■ DNA コンピューティング

情報科学の分野では、自然界に見られる現象にならって新しい演算モデルをつくる研究を「自然計算 (Natural Computing)」と呼んでいる。RSA 暗号の発明者と知られる情報科学者の Adleman が、DNA

の反応を利用して巡回セールスマン問題を解いたことを契機として、「DNA コンピューティング」研究が始まった (☞ 35) [3]. DNA でナノ構造をつくり (構造 DNA ナノテクノロジー), それを動かす (動的 DNA ナノテクノロジー) 研究の先に, 知的な分子システムをつくる分子ロボットの研究が待っている. BIOMOD でも DNA ナノ構造体の構築だけにとどまらず, 生体分子の可能性を存分に引き出して, 生物を凌駕するような賢いシステムをデザインしてほしい.

■ 分野融合チームをつくろう

以上みてきたように, BIOMOD で求められる研究は学際融合的である. DNA やタンパクなどは生体高分子であり, 実験を行う上で化学の知識は必須であるし, 高分子物理の知識は詳細な解析の役に立つ. また, 分子ロボットの設計を目指すなら機械工学やプログラミングの知識も身につけたいし, 電子工学に熟練していればオリジナルな計測法を思いつくかもしれない. また, 分子システムで何を実現するのかを考えるためには生物学や医薬, 情報科学に関する幅広い知識があると良い. ただ, これらすべてを短期間で身につけるのは非現実的だ. プロジェクト研究を成功させるために重要なことは, 何でも自分でやろうとするのではなく, チームのメンバーどうしがきちんとコミュニケーションをとってお互いをサポートしながら, 適材適所で計画的に動くことである. 研究室に配属される前の自由に研究できる時期に, ぜひ学科を超えて分野融合チームをつくってほしい! 最後に, 日本チームで課題となるのはやはり英語である. 世界で活躍する研究者やエンジニアを目指して語学にも力を入れよう.

参考文献

- [1] N. Seeman, *J. Theor. Biol.*, 1982, 99, 237.
- [2] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, Jr., F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature*, 2000, 406, 605.
- [3] L. Adleman, *Science*, 1994, 266, 1021.

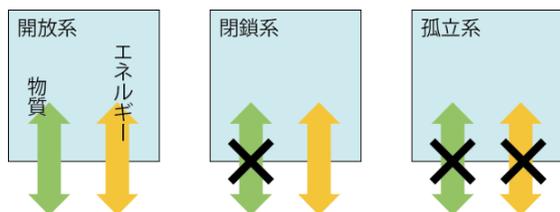
小宮 健 (東京工業大学)

37. 熱力学の基礎知識

DNA の熱力学的性質を理解するうえで重要となる、内部エネルギーやエンタルピー、エントロピーなどの概念を導入する。少々退屈な章になるかもしれないが、お付き合いいただきたい。

■ 基本的な概念：系と外界

世界はふたつに分けられる。系と外界である。系とはわれわれが着目している部分であり、外界はそれ以外の部分を指す。熱力学的な系には、大きく分けて 3 つの種類がある。外界と物質やエネルギーの交換がある開放系、エネルギーの交換はあるが物質のやりとりはない閉鎖系、そして、エネルギーも物質も交換されない孤立系である。



ここでいう系のエネルギーとは、系が仕事を
する能力のことである。仕事とは力に逆らっている
ものを動かすときになされるもので、たとえば、
ある気体が膨張したときにはそれが外界に対して
仕事をしたという。熱力学では系の内部に蓄えら
れているエネルギーを内部エネルギーと呼ぶ。内
部エネルギーは外界からの仕事や熱の移動によっ
て変化することが実験的に分かっている。

■ 熱力学第一法則

内部エネルギー U は系の現在の状態 (温度、体積など) のみによって決まる状態関数であり、変化させた経路には依存しない。よって、ある系をはじめの状態から終わりの状態へと変化させたとき、系に与えられた仕事と熱量の和は経路に依らず一定となる。また、孤立系の内部エネルギーは一定であることが経験則的に知られている。これが熱力学第一法則 (エネルギー保存則) である。系になされた仕事を w 、与えられた熱量を Q 、内部エネルギーの変化を ΔU と書くと、これらの事実は

$$\Delta U = w + Q \quad (1)$$

という式で表現される。

■ エンタルピー

圧力 p のもとで系の体積が微小量 dV だけ変化したとき、外界からなされる微小仕事 $d'w$ は

$$d'w = -pdV \quad (2)$$

と表される (圧力-体積仕事)。系に対する仕事が圧力-体積仕事のみである場合には、微小な熱量 $d'Q$ や仕事 $d'w$ に対する内部エネルギーの微小変化 dU は、(1)、(2)式より

$$\begin{aligned} dU &= d'w + d'Q \\ &= d'Q - pdV \end{aligned} \quad (3)$$

となる。一定体積のもとで内部エネルギーを変化させた場合には $dV = 0$ であるから、内部エネルギー変化は与えられた熱量に等しいことが分かる。一方で、一定圧力のもとで変化させた場合には、系が自由に体積変化するため、与えられた熱量がそのまま内部エネルギーの変化分になるわけではない。そこで、新しくエンタルピーという状態量を以下のように導入する。

$$H = U + pV \quad (4)$$

エンタルピーの微小変化は

$$dH = dU + pdV + Vdp \quad (5)$$

であるから、一定圧力かつ仕事が圧力-体積仕事の場合には、式(3)を用いると

$$dH = d'Q \quad (6)$$

となり、エンタルピー変化が与えられた熱量に等しくなることが分かる。つまり、エンタルピーとは一定圧力のもとで系が持つエネルギーと捉えることができる。

■ 熱力学第二法則

われわれの身のまわりで起こる現象には、自発的に起こりうる現象と、そうでないものがある。たとえば、やかんで沸かしたお湯は時間がたつと周

りの温度まで自然に冷えていくが、その逆に常温の水がひとりでに沸騰することはない。このような自発過程とそうでない過程を区別することは、熱力学第二法則によってまとめられる(☞ 38[2])。第二法則には様々な表現があるが、すべて同等のことを表している。たとえば、クラウジウスは以下のように表現した。

・クラウジウスによる表現
熱が高温から低温へ移る現象は不可逆である。 言い換えると、熱を低温から高温へ移し、その他に何の変化も残らないようにすることは不可能である。

「不可逆である」とは、系を元の状態に戻した際に外界に変化が残らないようにすることが不可能であることを意味している。逆に、可逆過程とは、系の状態を元に戻し、かつ外界にもまったく変化が残らないようにすることが可能な過程を指す。

■ クラウジウスの不等式

n 個の熱源から熱量 Q_i を得て、循環過程で仕事 w をして元の状態に戻るサイクル(熱機関)を考える。各々の熱源の温度を T_i とすると

$$\sum_{i=1}^n \frac{Q_i}{T_i} \leq 0 \quad (7)$$

が成り立つ*。これはクラウジウスの不等式と呼ばれており、熱力学第二法則の数式による表現である。 $n \rightarrow \infty$ の極限を考えると、連続的に状態が変化する任意の熱サイクルについて

$$\oint \frac{d'Q}{T} \leq 0 \quad (8)$$

が成立する。ここで、式(7)、(8)の等号が成り立つのはサイクルが可逆過程のときである。

■ エントロピー

エントロピー S は以下のように定義される。

$$\left(\int_A^B \frac{d'Q}{T} \right)_{\text{rev}} = S(B) - S(A) \quad (9)$$

左辺は、状態 A から状態 B へ可逆過程で変化させ

たことを示している。不可逆過程で系の状態を A から B へ変化させ、その後可逆過程で B から A へ戻すサイクルを考えると、式(8)より

$$\begin{aligned} \left(\int_A^B \frac{d'Q}{T} \right)_{\text{irr}} + \left(\int_B^A \frac{d'Q}{T} \right)_{\text{rev}} \\ = \left(\int_A^B \frac{d'Q}{T} \right)_{\text{irr}} - \left(\int_A^B \frac{d'Q}{T} \right)_{\text{rev}} < 0 \end{aligned} \quad (10)$$

となる。よって式(9)より

$$\left(\int_A^B \frac{d'Q}{T} \right)_{\text{irr}} < S(B) - S(A) \quad (11)$$

ゆえに、一般の状態変化に対して

$$\int_A^B \frac{d'Q}{T} \leq S(B) - S(A) = \Delta S \quad (12)$$

が成立する。微小変化に対しては $dS \geq d'Q/T$ と書ける。断熱変化のときには $d'Q = 0$ なので

$$dS \geq 0 \quad (13)$$

となる。これはエントロピー増大則と呼ばれ、孤立系での自発的变化においてはエントロピーが減少することはないことを示している。

■ 統計力学から見たエントロピー

統計学的にはエントロピーは

$$S = k_B \ln W \quad (14)$$

と表される(ボルツマンの原理)。 W は、定められた巨視的状态に対して系が取り得る微視的状态の数である。たとえば、ある体積が与えられたときに系の中の各分子がとり得る位置というのは一意には決まらない。体積 V の空間を体積 δV の微小空間に分割して n 個の分子を配置することを考えると、取りうる状態の数は $W = (V/\delta V)^n$ になる。よって、単純に考えれば、分子数や体積が増加すればエントロピーも増加することが分かる。

W が大きいほど、つまり系が乱雑であるほどエントロピーは大きくなる。ゆえに、エントロピー増大則は、自発過程においては系がより乱雑な無秩序状態へとむかうことを意味している。

*詳細な導出については☞ 38 参考文献[2]、[3]等を参照されたい。

38. 自由エネルギーと化学平衡

自由エネルギーとは、自発過程や平衡状態の指標となる重要な熱力学的状態量である。特に、定温定圧条件下でよく用いられるものがギブズエネルギーであり、これは平衡定数とも密接な関係を持つ。

■ ギブズの自由エネルギー

系の状態が一定圧力のもとで変化するとき、圧力-体積仕事以外の仕事があれば $dH = d'Q$ となる (☞ 37)。エントロピーの式より $dS \geq d'Q/T$ なので、 $dH - TdS \leq 0$ が成り立つ。ここで、新しい熱力学的状態量である ギブズエネルギー を以下のよう
に定義する。

$$G = H - TS \quad (1)$$

微小変化は $dG = dH - TdS - SdT$ と書ける。特に、定温変化のときには、先ほどの不等式より

$$dG = dH - TdS \leq 0 \quad (2)$$

となることが分かる。つまり、定圧・定温の系で起こる 自発的变化はギブズエネルギーが最小となる方向にむかう ことが分かる。一般的な化学実験では一定圧力のもとでの化学反応に着目することが多いため、この指標がよく使われる。

■ ギブズエネルギーの圧力依存性

ここからは、仕事が圧力-体積仕事のみの場合に閉鎖系で起こる可逆変化を考える。このとき、内部エネルギー U 、エンタルピー H 、ギブズエネルギー G という 3 つの状態量の微小変化は

$$dU = d'Q - pdV = TdS - pdV \quad (3)$$

$$\begin{aligned} dH &= dU + pdV + Vdp \\ &= TdS + Vdp \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} dG &= dH - TdS - SdT \\ &= -SdT + Vdp \end{aligned} \quad (5)$$

のように、各々ふたつの状態量の微小変化に依存する形で書き表せる。これに基づき、 G を温度と圧力の関数とみなして完全微分すると

$$dG = \left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_p dT + \left(\frac{\partial G}{\partial p}\right)_T dp \quad (6)$$

と表すことができる。微分の添え字は、それぞれ p と T が一定のもとで T と p に関して G を偏微分する

ことを示している。式(5)と式(6)を比較すると

$$\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_p = -S, \quad \left(\frac{\partial G}{\partial p}\right)_T = V \quad (7)$$

であることが分かる。 S 、 V は常に正であるから、ギブズエネルギーは温度が上昇すると減少し、圧力が増加すると増加することになる。

さて、定温 ($dT = 0$) で圧力を p_1 から p_2 まで変化させたときの G の変化は、式(5)を用いると

$$\Delta G = G_2 - G_1 = \int_{p_1}^{p_2} dG = \int_{p_1}^{p_2} V dp \quad (8)$$

で求められる。理想気体の場合には $pV = nRT$ (ボイル=シャルルの法則) が成り立つので、

$$\Delta G = nRT \int_{p_1}^{p_2} \frac{1}{p} dp = nRT \ln \frac{p_2}{p_1} \quad (9)$$

となる。標準圧力 $p^0 = 1\text{bar}$ のもとで純粋な形にある状態 (標準状態) でのギブズエネルギーを G^0 と書くと、圧力 p におけるギブズエネルギーは

$$G = G^0 + nRT \ln \frac{p}{p^0} \quad (10)$$

のように標準状態を基準に表現される。あるいは、 $p^0 = 1$ となる単位系を選ぶことで

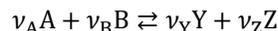
$$G = G^0 + nRT \ln p \quad (11)$$

と書き表すことができる。

■ 化学平衡

可逆反応の順方向の反応速度と逆方向の反応速度が釣り合っていて、巨視的には物質の濃度が変化しない状態を 化学平衡 と呼ぶ。

まず、以下の可逆反応を考えよう。



ここで、大文字アルファベット A 、 B 、 Y 、 Z は分子種を表し、係数の ν_i は各々の 化学量論係数 (反応に使われるモル数比) を表している。順方向の反応により A 、 B がそれぞれ $dn_A \text{mol}$ 、 $dn_B \text{mol}$ 反応して

Y, Zが dn_Y mol, dn_Z mol 生成されたとすると,

$$-dn_A: -dn_B: dn_Y: dn_Z = \nu_A: \nu_B: \nu_Y: \nu_Z$$

となるため,

$$\frac{-dn_A}{\nu_A} = \frac{-dn_B}{\nu_B} = \frac{dn_Y}{\nu_Y} = \frac{dn_Z}{\nu_Z} = d\xi \quad (12)$$

が成り立つ. ξ は反応進行度 (☞ 39) である.

温度と圧力が一定のとき, この化学反応系のギブズエネルギーの全微分は以下の式で表される.

$$dG = \sum \mu_i dn_i \quad (13)$$

$$\mu_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{p, T, n_{j \neq i}} \quad (14)$$

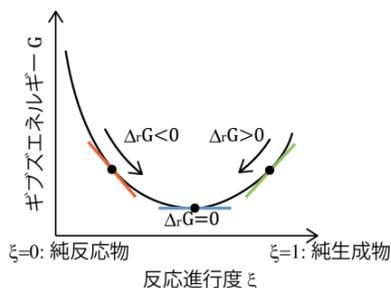
μ_i は化学ポテンシャルと呼ばれる状態量であり, 成分*i*の単位物質あたりのギブズエネルギーと解釈できる. 式(12)を用いると式(13)は

$$dG = (\nu_Y \mu_Y + \nu_Z \mu_Z - \nu_A \mu_A - \nu_B \mu_B) d\xi \quad (15)$$

と書き直せる. ここで, 反応進行度の変化に対するギブズエネルギー変化として, 反応ギブズエネルギー $\Delta_r G$ を定義すると, 式(15)より

$$\Delta_r G = \left(\frac{\partial G}{\partial \xi} \right)_{p, T} = \nu_Y \mu_Y + \nu_Z \mu_Z - \nu_A \mu_A - \nu_B \mu_B \quad (16)$$

となる. すなわち, $\Delta_r G$ は, 反応混合物の組成における反応物と生成物の化学ポテンシャルの差で表される. 自発的に起こる反応はギブズエネルギーが減少する方向に進行するため, $\Delta_r G < 0$ であれば順方向に, $\Delta_r G > 0$ であれば逆方向に反応が進むことが分かる. また, $\Delta_r G = 0$ のであれば, それ以上反応が進行しない平衡状態となる.



■ 平衡定数とギブズエネルギー

理想気体においては, 式(11), (14)より

$$\mu_i(T, p) = \mu_i^0(T) + RT \ln p_i \quad (17)$$

となる. ここで, p_i は成分*i*の分圧である. よって, 反応ギブズエネルギーは, 標準反応ギブズエネルギー $\Delta_r G^0 = \nu_Y \mu_Y^0 + \nu_Z \mu_Z^0 - \nu_A \mu_A^0 - \nu_B \mu_B^0$ を用いて

$$\Delta_r G = \Delta_r G^0 + RT \ln \frac{(p_Y)^{\nu_Y} (p_Z)^{\nu_Z}}{(p_A)^{\nu_A} (p_B)^{\nu_B}} \quad (18)$$

と書ける. 平衡状態では $\Delta_r G = 0$ となるから, 平衡状態における各成分の分圧を p_i^{eq} と書く

$$\Delta_r G^0 = -RT \ln \frac{(p_Y^{\text{eq}})^{\nu_Y} (p_Z^{\text{eq}})^{\nu_Z}}{(p_A^{\text{eq}})^{\nu_A} (p_B^{\text{eq}})^{\nu_B}} \quad (19)$$

が導かれる. ここで, 平衡状態における反応物と生成物の分圧の比を K_p と書く

$$\Delta_r G^0 = -RT \ln K_p \quad (20)$$

となる. K_p は圧平衡定数と呼ばれる.

理想気体ではなく一般の溶液の場合には, 分圧の代わりに活量と呼ばれる物理量 a_i を用いて

$$\mu_i(T, p) = \mu_i^0(T) + RT \ln a_i \quad (21)$$

と表される. 活量は一般には温度, 圧力, 物質量の複雑な関数になるが, モル分率あるいは他の濃度に近い性質を持つ量である. 特に, 希薄溶液ではモル分率 $x_i = n_i/n$ と等しくなる[1]. 活量で表した平衡定数

$$K = \frac{\sum_{\text{product}} (a_j^{\text{eq}})^{\nu_j}}{\sum_{\text{reactant}} (a_i^{\text{eq}})^{\nu_i}} \quad (22)$$

は熱力学的平衡定数と呼ばれ, 一般の溶液の場合には, これを用いて $\Delta_r G^0 = -RT \ln K$ と書ける.

また, 希薄溶液では溶媒のモル分率はモル濃度で置き換えた濃度平衡定数 K_c を用いて

$$\Delta_r G^0 = -RT \ln K_c \quad (23)$$

で代用されることが多い[2].

参考文献

- [1] 田崎晴明, 熱力学, 培風館 (2000)
- [2] アトキンス他, 物理化学 (上・下) 第8版, 東京化学同人 (2009)
- [3] マッカーリ, サイモン他, 物理化学 (上・下), 東京化学同人 (1999)

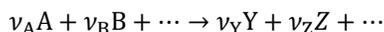
高島英弥 (東北大学)

39. 反応速度論

反応速度論とは、反応進行度の時間変化（反応速度）を扱う分野である。一般的な化学反応はもとより、DNA分子同士のハイブリダイゼーションやディナチュレーション、鎖置換反応についても、反応速度論を用いてその反応機構が議論されている。ここでは、反応速度論の基礎的な知識を紹介する。

■ 反応速度式と反応次数

次のような任意の化学反応式を考える。



初期状態からどれだけ反応が進んだかを表す量である反応進行度 ξ を用いると、時刻 t でのモル数は

$$n_A(t) = n_A(0) - \nu_A \xi(t)$$

⋮

$$n_Y(t) = n_Y(0) + \nu_Y \xi(t)$$

⋮

と書ける。したがって、時間に対するモル数の微小変化は以下のように表される。

$$\frac{dn_A(t)}{dt} = -\nu_A \frac{d\xi(t)}{dt}$$

⋮

$$\frac{dn_Y(t)}{dt} = \nu_Y \frac{d\xi(t)}{dt}$$

⋮

系の体積 V が一定であれば、各々の分子の濃度 $[A] = n_A/V, \dots$ の時間変化について

$$-\frac{1}{\nu_A} \frac{d[A]}{dt} = \dots = \frac{1}{\nu_Y} \frac{d[Y]}{dt} = \dots = \frac{1}{V} \frac{d\xi}{dt} = v(t)$$

と書ける。この v を反応速度と呼ぶ。実験的に得られる反応速度は、一般に反応物の濃度に依存することが知られており、反応速度定数 k を用いて次のような式で表される。

$$v(t) = -\frac{1}{\nu_A} \frac{d[A]}{dt} = k[A]^\alpha [B]^\beta \dots$$

このような式を反応速度式と呼び、べき乗係数の総和 $n = \alpha + \beta + \dots$ を全反応次数という。また、各々の分子種についても各べき数をその分子種に対する反応の次数と呼び、この場合ではAについて α 次、Bについて β 次であるという。

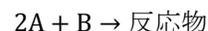
■ 素反応と複合反応

一般的な化学反応では反応中間体が存在し、



のように多段階で反応が進むことが多い。中間体のない、1段階で進行する反応のことは素反応と呼び、複数の素反応から構成される（多段階で進行する）反応を複合反応と呼ぶ。複合反応を素反応の序列で表現したものが反応機構である。

多くの化学反応では反応次数は反応物の化学量論係数とは無関係の値になるが、素反応では両者が一致する。たとえば



で表される素反応は、Aについて2次、Bについて1次の3次反応であり、ゆえに速度式は

$$v(t) = k[A]^2[B]$$

と書くことができる。

■ 1次反応、2次反応の積分形速度式

速度式を積分すると、反応物や生成物の濃度を時間の関数として得ることができる。その解を積分形速度式と呼ぶ。

0次反応であれば、反応速度式は $v(t) = k$ となり、濃度に依存しない一定の速度で反応が進む。ゆえに、反応物の濃度は $[A] = [A]_0 - kt$ のように初期値 $[A]_0$ から直線的に減少していく。それでは1次反応、2次反応の場合はどうなるだろうか。まず、



という化学反応式で表される1次反応を考えよう。反応速度式は以下のように書ける。

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]$$

この微分方程式は容易に解けて、Aの初期濃度を $[A]_0$ とすると以下の積分形速度式が得られる。

$$[A] = [A]_0 e^{-kt}$$

よって、1 次反応では反応物の濃度が初期濃度から指数関数的に減少することが分かる。この式は

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt$$

と書きかえることもできる。つまり、実験等により観測した化学反応が 1 次反応であれば、濃度の対数を時間に対してプロットすると直線になり、その傾きから反応速度定数を得ることができる。

次に 2 次反応を考えよう。反応物が 1 種類の場合には反応速度式は

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2$$

となるため、積分形速度式は

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = kt \quad \text{あるいは} \quad [A] = \frac{[A]_0}{1 + kt[A]_0}$$

と書くことができる。

反応物が 2 種類の場合の反応速度式は

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][B]$$

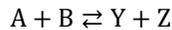
であり、2 種類の反応物の濃度が等しい ($[A] = [B]$) ときには、1 種類の場合と同じ式になる。一方、濃度が異なる場合には、

$$\ln \frac{[A]}{[B]} = ([A]_0 - [B]_0)kt + \ln \frac{[A]_0}{[B]_0}$$

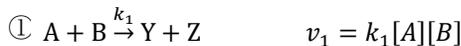
のように積分形速度式が求められる。

■ 可逆反応と濃度平衡定数

複合反応がどのような反応速度式で表されるのか、簡単な例として可逆反応の場合を紹介する。



で表される可逆反応は、正反応 (\rightarrow) と逆反応 (\leftarrow) という以下のふたつの素反応からなっている。



分子 A は①の反応によって $k_1[A][B]$ の速度で消費され、②の反応により $k_{-1}[Y][Z]$ の速度で生成される。よって反応全体での正味の速度式は

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[Y][Z]$$

と書ける。これを解析的あるいは数値的に解くことで時間に関する濃度の式が得られる。

ここで、平衡状態について考えてみよう。平衡状態では正反応と逆反応の反応速度が等しくなるため、以下の式が成立する。

$$v_1^{\text{eq}} = v_{-1}^{\text{eq}} \Rightarrow k_1[A]^{\text{eq}}[B]^{\text{eq}} = k_{-1}[Y]^{\text{eq}}[Z]^{\text{eq}}$$

ゆえに、濃度平衡定数 K_c と反応速度定数との間に

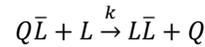
$$K_c = \frac{[Y]^{\text{eq}}[Z]^{\text{eq}}}{[A]^{\text{eq}}[B]^{\text{eq}}} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

という関係が成り立つことが分かる。

■ DNA 分子反応と反応速度論

DNA 分子反応もこのような化学反応速度式で近似的に記述される。その際は、DNA が完全に 1 本鎖の状態か完全に 2 本鎖の状態かのいずれかのみをとるとする二状態モデル (☞ 41) を仮定することが一般的である。

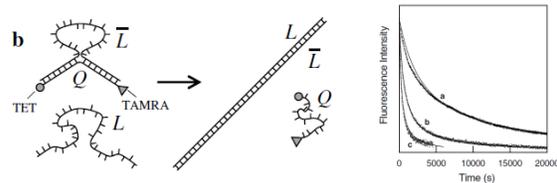
例として、図に示されるような反応は



という 2 次の素反応とみなすことができる。よって、蛍光分光光度計 (☞ 81) を用いた実験で得られる蛍光強度の時間変化 ($Q\bar{L}$ の濃度変化) を、2 次反応の積分形速度式

$$I(t) = \frac{I(0) - I(\infty)}{1 + ktc_0} + I(\infty)$$

で fitting することにより、反応速度定数 k を見積もることも可能である [1]。



反応の模式図と蛍光強度変化のグラフ [1].
Reprinted with permission from PRL, 2003.

参考文献

[1] A. J. Turberfield *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 118102 (2003).

*反応速度論に関してもっと詳しく知りたい場合は ☞ 38 参考文献 [2], [3] 等を参照されたい。

高島英弥 (東北大学)

40. DNA の分子構造

デオキシリボ核酸 (deoxyribo nucleic acid : DNA) の略称で、遺伝情報を担い、細胞の核や核様体に存在する高分子物質である。生体システムにとって必要不可欠な“プログラム”を記憶している。本章では、その分子構造について説明する。

■ 二重らせん

DNA の二重らせん構造 (double helix) は、1953 年に Watson と Crick の 2 人の科学者により発表された(図 1)[1]。二重らせんの直径は約 2 nm、1 回転あたりの長さは約 3.4 nm である。二重らせん中には長さが異なる 2 種類の溝が存在し、広い方を主溝 (major groove)、狭い方を副溝 (minor groove) と呼ぶ。1 本の DNA が 2 本絡み合い二重らせんを形成している時、二本鎖 DNA (double-stranded DNA) あるいは DNA 二本鎖 (DNA double strand) と呼び、1 本ずつの時は一本鎖 DNA (single-stranded DNA) や DNA 一本鎖 (DNA single strand) と呼ぶ。また、一般的な二重らせんは B 型と呼ばれる構造で、特殊な条件下で A 型や Z 型の二重らせんが存在し、1 回転あたりの塩基数や塩基対間距離が異なる(表参照)。

■ 塩基

DNA を形成する塩基には、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)と 4 つある(図 2)。塩基(Base)、糖、リン酸から構成されるものをヌクレオチドと呼ぶ(図 2)。糖の 1' 位の炭素に塩基が結合した化合物をヌクレオシドといい、ヌクレオシドの 5' 位にリン

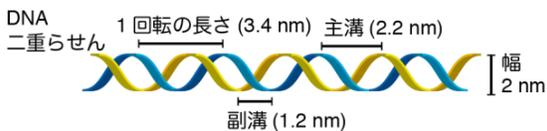


図 1. DNA 二重らせん

	らせんの 向き	らせんの 直径	1 回転あた りの塩基数	塩基対間 距離
A 型	右巻き	2.3 nm	11	0.26 nm
B 型	右巻き	2 nm	10.5	0.34 nm
Z 型	左巻き	1.8 nm	12	0.37 nm

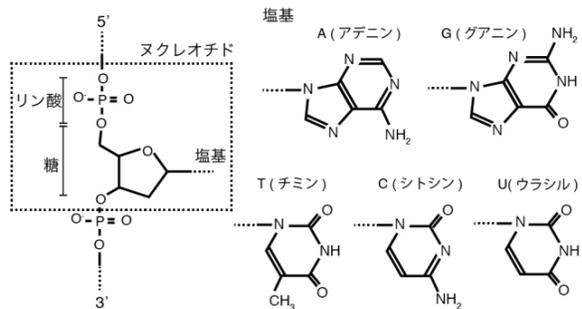


図 2. ヌクレオチドと塩基

酸がエステル結合した化合物がヌクレオチドである [2]。各 1 本鎖 DNA の両端を末端と呼び、5' 位炭素原子側を 5' 末端、3' 位炭素原子側を 3' 末端と呼び、表記は図 2 のように 5' 末端から 3' 末端の向きに描く。二本鎖 DNA を形成するとき、2 本の一本鎖 DNA は互いに反対の向き(逆平行)で結合する。

■ 塩基対と相補鎖

DNA が二重らせん構造を形成するとき、DNA の塩基は水素結合によりワトソン-クリック塩基対を形成する。ワトソン-クリック塩基対では、A と T、G と C の間でのみ塩基性を形成する(図 3)。A と T の間の水素結合は 2 本、G と C の間では 3 本なので、A と T よりも G と C の結合の方が強く、G と C の含量が多いほど二重らせんの安定性は高くなる [2]。例として、5'-ATGCGTA-3'には 5'-TACGCAT-3'という配列しか安定な二重らせん構造を形成しない。これを塩基の相補性(complementarity)と呼ぶ。互いに相補的な配列であることから、相補配列や相補鎖と呼ばれる。さらに、複数の塩基対が隣接して形成されると、塩基対同士が積み重なり、お互いの塩基対を安定させる。この塩基対同士に働く相互作用をスタッキング(stacking)と呼ぶ。以上のように、DNA の二重らせんは、ワトソン-クリック塩基対の水素結

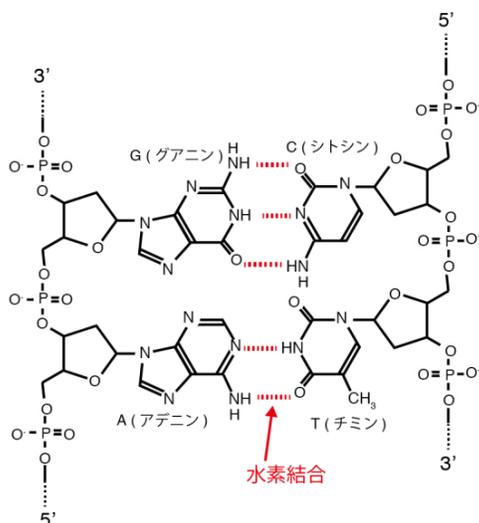


図 3. DNA の模式的な表記法と塩基対形成

合と塩基対同士の間でスタッキングで安定化している。DNA の長さは、一本鎖の時はヌクレオチド (塩基) の数(nt: nucleotide)と、二本鎖の時は、塩基対の数(bp: base pair)で表される。たとえば、20 塩基の一本鎖 DNA は 20 nt, 20 nt の一本鎖 DNA 同士が完全相補鎖を形成した時 20 bp と表記される。

■ DNA の融解とハイブリダイゼーション

二重らせん構造を形成している DNA は熱を加えることで、一本鎖 DNA に分離する。この反応を変性 (denaturation), または融解 (melting) と呼ぶ。一方で、二本鎖になることをハイブリダイゼーション (hybridization) と呼ぶ。DNA は 0°C から 100°C の領域では安定な物質なので、冷却と加熱を繰り返して融解とハイブリダイゼーションを何度も繰り返すことが可能である [2]。

コラム RNA

DNA と類似の高分子に RNA (ribonucleic acid) がある。DNA と RNA の大きな違いは 2 つある。1 つ目が、ヌクレオチドを構成している糖が異なる。RNA を構成しているヌクレオチドの糖は、糖の 2' 位に水酸基 (-OH) がついているリボースである。もう一つが、使用する塩基の違いである。RNA では DNA で使われている T (チミン) の代わりに、U (ウラシル) が使われており、T と U の違いはメチル基 (-CH₃) があるかどうかである。

参考文献

- [1] J. D. Watson and F. H. Crick, "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid" *Nature* **1953**, 171, 737-738
- [2] 小宮 健, 瀧ノ上 正浩, 田中 文昭, 浜田 省吾, 村田 智, DNA ナノエンジニアリング, ナチュラルコンピューティングシリーズ, 近代科学社

41. DNA ハイブリダイゼーションの熱力学

DNA は A と T, G と C で塩基対形成をすることはすでに学んだ (☞ 40) . ある塩基配列を持つ DNA が, その相補的な塩基配列を持つ DNA と塩基対形成を通じて会合することをハイブリダイゼーションと呼ぶ. ハイブリダイゼーションの安定性は熱力学を利用して見積もることができる.

■ DNA ハイブリダイゼーション: 二状態モデル

100 base 程度以下の短い DNA では, 1 本鎖の状態とハイブリダイゼーションした 2 本鎖の状態の二状態のみを考えた平衡化学反応によってモデル化できる. これを二状態モデルと呼ぶ. なお, キロ base 程度以上の場合, 部分的に塩基対がほどけたりするため, 二状態モデルで考えることが難しくなる.

■ DNA ハイブリダイゼーションと融解温度

ここで, ある配列を持つ 1 本鎖 DNA を S , その相補鎖の 1 本鎖 DNA を \bar{S} とし, それらがハイブリダイゼーションした 2 本鎖 DNA を D と呼ぶことにする. 二状態モデルで考えた場合,



の化学平衡が成立する. DNA の初期濃度 (混合した直後の濃度) を $[S] = [\bar{S}] = C$ とし, 平衡状態に達した時にハイブリダイゼーションしている割合を a すると, 平衡定数 K は,

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[D]}{[S][\bar{S}]} = \frac{aC}{(1-a)^2 C^2} = \frac{a}{(1-a)^2 C} \quad [2]$$

となる. 熱力学 (☞ 37,38) より, 自由エネルギー DG , エンタルピー DH , エントロピー DS について,

$$DG = -RT \ln K \quad [3]$$

$$DG = DH - TDS \quad [4]$$

が成り立ち (T : 絶対温度; $R = 1.987 \cdot 10^{-3}$ [kcal \cdot mol $^{-1}$ \cdot K $^{-1}$]: 気体定数; $\ln \circ \log_e$),

$$-RT \ln \left(\frac{a}{(1-a)^2 C} \right) = DH - TDS \quad [5]$$

の関係が導かれる. ここで, ハイブリダイゼーションしている DNA 分子と 1 本鎖状態の DNA 分子の割合が 1:1 となるような温度を融解温度 (melting temperature; T_m) と呼ぶ. つまり, 式[5]に $a = 0.5$,

$T = T_m$ を代入し, 変形すると,

$$T_m = \frac{DH}{R \ln(C/2) + DS} \quad [6]$$

が得られる. 初期濃度 C , DNA の熱力学パラメータ DH , DS が分かれば, T_m を計算することができる. T_m は DNA ハイブリダイゼーションの安定性の指標として非常によく利用されている. T_m が高い DNA のハイブリダイゼーションほど安定である.

■ DNA 分子内反応と融解温度

ヘアピン構造などの分子内での塩基対形成による DNA の構造の安定性も同様に融解温度で見積もることができる. 分子内反応は, 2 つの分子の会合ではないので, ハイブリダイゼーションとは呼ばないが, 同様に扱えるので紹介する. ある配列を持つ 1 本鎖 DNA を S , これがヘアピン構造を取った状態を H と呼ぶことにする. 二状態モデルで考えると,



DNA の初期濃度を $[S] = C$ とし, 平衡状態に達した時のヘアピン状態の割合を a すると,

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[H]}{[S]} = \frac{aC}{(1-a)C} = \frac{a}{1-a} \quad [8]$$

となる. 上記と同様の計算で, T_m は,

$$T_m = DH / DS \quad [9]$$

と計算できる. ハイブリダイゼーションの場合と異なり, T_m が C に依存しないという特徴がある.

■ Nearest-Neighbor (最近接) 法による自由エネルギー ΔG の計算と T_m 予測

ここまでで, DNA の熱力学パラメータ DH , DS が分かれば, T_m , すなわち DNA の安定性を算出することができることが分かった. ここでは, 図 1 の DNA を例にとり, DH と DS を計算するための方法である

Nearest-Neighbor (最近接) 法 (NN 法) を説明する. NN 法は, 塩基対の水素結合のエネルギーではなく, 隣り合う塩基対の間に働くスタッキング相互作用がハイブリダイゼーションの安定化に支配的であることをモデル化した方法である. 図 1 のような DNA の場合, 左から,



というように, 塩基対を 2 つずつペアにして, それぞれの DH と DS を表 1 から選んで足し合わせるとハイブリダイゼーションした DNA 全体の DH と DS が計算できる. なお, 末端の効果は, 表 1 の GC-term, AT-term を利用する. すなわち,

$$\begin{aligned} \Delta H &= \Delta H_{\text{AT-term}} + \Delta H_{\text{TG/AC}} + \Delta H_{\text{GT/CA}} \\ &\quad + \Delta H_{\text{TT/AA}} + \dots + \Delta H_{\text{GC/CG}} + \Delta H_{\text{GC-term}} \\ &= 2.3 + (-8.5) + (-8.4) + (-7.9) \\ &\quad + \dots + (-9.8) + 0.1 = 177.2 \text{ [kcal} \cdot \text{mol}^{-1}] \end{aligned}$$

同様に計算して,

$$DS = -0.4827 \text{ [kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}]$$

初期濃度が $C = 0.5 \text{ mM}$ であるとする, 式[6]から,

$$T_m = 345.48 \text{ [K]} = 72.3 \text{ [}^\circ\text{C]}$$

と計算できる. ただし, これは 1 M Na^+ 条件下での値である. T_m の塩濃度依存性は DS の塩濃度依存性に起因し, 経験的に

$DS([\text{Na}^+]) = DS(1 \text{ M}) + 0.368N \ln([\text{Na}^+] \text{ M})$ [10] の関係が知られている[2]. ここで, N はスタック数 (塩基長-1) である. 例えば, 0.1 M Na^+ 条件下では,

$$\begin{aligned} DS(0.1 \text{ M}) &= DS(1 \text{ M}) + 0.368 \times (23 - 1) \times \ln(0.1) \\ &= -0.50225 \text{ [kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}] \end{aligned}$$

より, T_m は

$$T_m = 332.80 \text{ [K]} = 59.6 \text{ [}^\circ\text{C]}$$

となり, 塩濃度が低いと T_m が下がることがわかる.

最後に, ヘアピルループ, バルジループなどの塩基対形成していない塩基 (ミスマッチ) を含む場合について触れる. この場合, NN 法だけでは計算できず, ミスマッチ部分のパラメータを入れる必要がある. たとえば, 塩基数 n 個のループの部分は,

$$DH = 0$$

$$DS(n > 9) = DS(9) - 1.75R \ln(n/9)$$

で計算できることが知られている (Jacobson-Stockmayer の式). $n \leq 9$ は, 表 2 にある値を用いる.



図 1. ハイブリダイゼーションした DNA. 縦線は塩基対形成を表す.

配列	ΔH (kcal · mol ⁻¹)	ΔS (cal · mol ⁻¹ · K ⁻¹)
GC/CG	-9.8	-24.4
CG/GC	-10.6	-27.2
GG/CC CC/GG	-8.0	-19.9
CA/GT TG/AC	-8.5	-22.7
GT/CA AC/TG	-8.4	-22.4
GA/CT TC/AG	-8.2	-22.2
CT/GA AG/TC	-7.8	-21.0
AA/TT TT/AA	-7.9	-22.2
AT/TA	-7.2	-20.4
TA/AT	-7.2	-21.3
GC-term	0.1	-2.8
AT-term	2.3	4.1
Symmetry correction	0	-1.4

表 1. 熱力学パラメータ (1 M Na^+ 下) [2].

ループ長 (n)	ΔS [cal · mol ⁻¹ · K ⁻¹]
3	-18
4	-18
5	-18
6	-17
7	-19
8	-18
9	-21

表 2. ループの熱力学パラメータ (1 M Na^+ 下) [3].

参考文献

- [1] 小宮健, 瀧ノ上正浩, 田中文昭, 浜田省吾, 村田智, “DNA ナノエンジニアリング”, 近代科学社 (2011/4/30), 202 ページ, ISBN: 978-4-7649-0402-6.
- [2] J. Santalucia-Jr, “A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1460–1465 (1998).
- [3] D. H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker, D. H. Turner, “Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure”, J. Mol. Biol. 288, 911–940 (1999).

瀧ノ上正浩 (東京工業大学)

42. 鎖置換反応

二重らせんの交換を行う DNA 鎖置換反応は、DNA ナノテクの分野で動的な機構を実現する基本的な方法の一つである。バッファーや温度などの反応条件は酵素反応に比べ緩く、DNA だけで反応が完結することが特徴である。DNA ナノ構造の変形や DNA 配列の変換に応用される。

■ 二重らせんが交換される

DNA 二重らせんを単位として静的なナノ構造作成を行うテクニックが発展する一方(☞17), DNA だけを用いて動的にシステムを変化させる方法が提案された[1](☞23). 基本は図 1 に示される鎖置換反応だ. 英語では「toehold-mediated strand displacement」や「DNA strand displacement (DSD)」と呼ばれる。

初期状態では左下の緑色と赤色の DNA が二重らせんを組んでいるが、青色の一本鎖 DNA が入力されると、赤色の DNA と二重らせんを形成し、緑色の DNA は一本鎖となる。反応の前後で相補的な塩基対による水素結合数が増えており、反応後の方が自由エネルギー的に有利(☞38)であることが分かる。

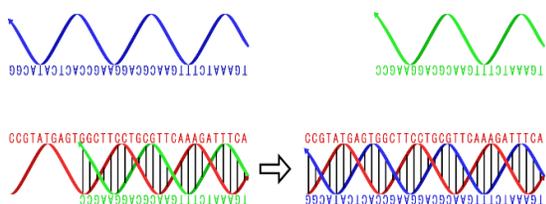


図 1 鎖置換反応

■ 交差点移動により反応が進む

上記の反応は実際には複数の中間状態を経て左から右へ進む。中間状態を順にいくつか示したのが図 2 である。まずは青色の DNA が赤色の DNA の一本鎖

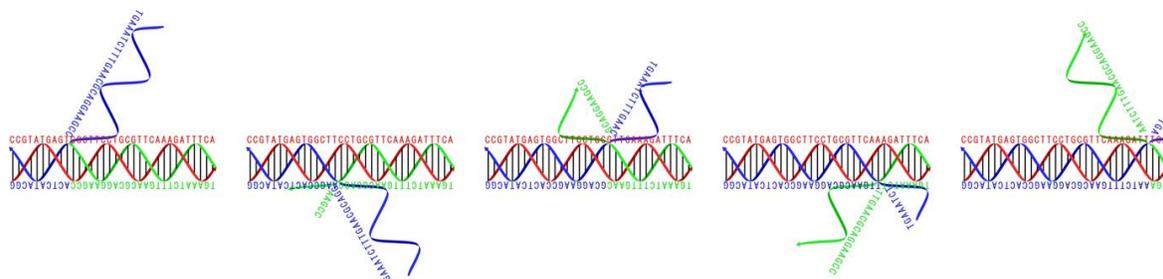


図 2 鎖置換反応の中間状態。ブランチマイグレーションと呼ばれ、左右に行ったり来たりする

になっている左側の部分にハイブリダイゼーションする。その後、青色と緑色の DNA は同一の配列を持っているため、赤色の DNA との水素結合を取り合う。

取り合う位置は交差点「ブランチングポイント」と呼ばれ、左右に行ったり来たりする。この反応は交差点移動「ブランチマイグレーション」と呼ばれる。最終的には、図 1 の右側のように青色の DNA は緑色の DNA を置換し、安定な赤色と青色の DNA の二重らせんを作り、緑色の DNA を一本鎖にする。

■ 燃料により反応が駆動される

反応を図示するときには、二重らせん構造を簡略化し、図 3 のように DNA を 5'末端から 3'末端への矢印で表すことが一般的である。配列は反応の単位毎に区切られ、それぞれにアルファベットを割り当ててある。このページではアルファベットの大文字と小文字は互いに相補な配列を表す。

出力される緑色の一本鎖 DNA に焦点を当てた場合、青色の DNA は反応を駆動する燃料「Fuel」、反応後の青色と赤色の完全な二重らせんは廃棄物「Waste」と一般に呼ばれる。また赤色の DNA の内、初期状態で一本鎖になっている a の部分は反応を開始させるための足がかり配列「Toehold」と呼ぶ。

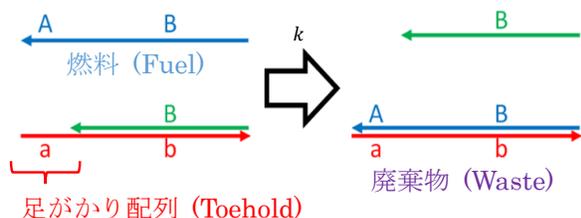


図3 鎖置換反応の簡略図と名称

■ 足がかかり配列が反応速度を決める

反応の速度は足がかかり配列の長さや DNA の濃度によって決まる。反応速度の議論を行うために、図3を**化学反応式で記述された2分子反応だと捉える**。

反応速度定数 k は、 a によって表される足がかかり配列の長さ n によって変更することができ、文献[2]によれば、置換する b が20塩基で、 25°C 、 11.5mM MgCl_2 のバッファー条件の場合、以下の式でおおよその値を見積もることができる。

$$k = \begin{cases} 5 \times 10^{n-1} [\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}] & (n \leq 6) \\ 3 \times 10^6 [\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}] & (6 < n) \end{cases}$$

式から分かるように、**足がかかり配列を1, 2, ..., 6塩基と伸ばすに従い、反応速度定数は10, 100, ..., 1000000倍と指数関数的に大きくなる**。ただし6塩基を超えると、速度定数は収束する。以上により、例えば左辺の2種類の分子の初期濃度を 10nM とすれば、開始から半数の分子が反応するまでのおおよその時間は、6塩基で3分、5塩基で30分、4塩基で5時間、..., とオーダーを調整することが可能である。この性質は鎖置換反応を複雑なシステムへ応用する際に重要となる(☞ 28)。

詳細な解析を行いたい場合は、上記の反応を2分子反応のハイブリダイゼーション、単分子反応のダイナチュレーションおよびブランチマイグレーションの3種類の反応に分割する[2]。さらに解析を自動化、設計支援を行う目的では、オンラインのシミュレータが公開されている(☞ 67)。一方で、実験的に正確な反応速度定数を求めるには、試験管による実験において蛍光を使って読み出し、経時観察を行う(☞ 51,81)。

■ 鎖置換反応の様々なバリエーション

上記で説明した反応はあくまで基本的な鎖置換反応であるが、配列の組み合わせ方を工夫したバリエーションが様々報告されている。図4は、2つの足がかかり配列で順方向と逆方向の双方に反応が起こる「toehold exchange」[2]、足がかかり配列と置換する配列の間にリンカーを挟み反応速度を遅くする「remote toehold」[3]、燃料となる分子を複数の分子によって形成する「associative toehold activation」[4]、それぞれの反応の簡略図を示している。

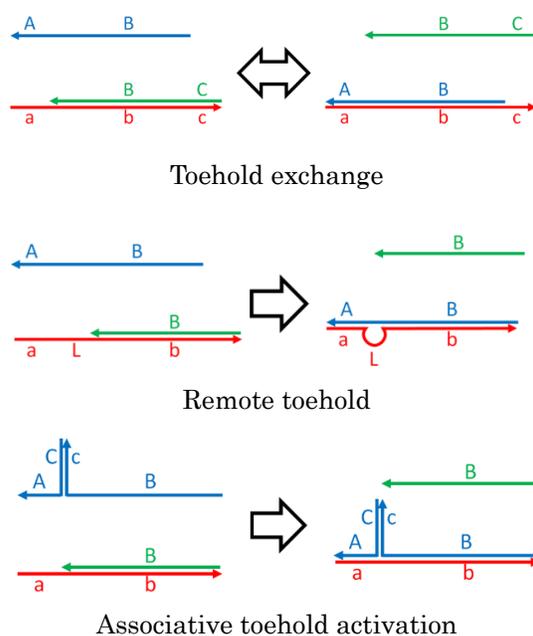


図4 様々な鎖置換反応

参考文献

- [1] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills Jr, F. C. Simmel, J. L. Neumann: "A DNA-fuelled molecular machine made of DNA", Nature, 406, 605-608, 2000
- [2] D. Y. Zhang, E. Winfree: "Control of DNA Strand Displacement Kinetics Using Toehold Exchange", Journal of the American Chemical Society, 131, 17303-17314, 2009
- [3] A. J. Genot, D. Y. Zhang, J. Bath, A. J. Turberfield: "Remote Toehold: A Mechanism for Flexible Control of DNA Hybridization Kinetics", Journal of the American Chemical Society, 133, 2177-2182, 2011
- [4] X. Chen: "Expanding the Rule Set of DNA Circuitry with Associative Toehold Activation", Journal of the American Chemical Society, 134, 263-271, 2012

43. DNA の 2 次構造

DNA の 2 次構造とは、DNA が形成している塩基対の集合によって定義された構造である。DNA を使った分子ロボットを作成する場合には、DNA の挙動を正確に予測し、実験者の意図した通りに塩基配列を設計する必要がある。そのための下準備として、本稿では DNA の 2 次構造について説明する。

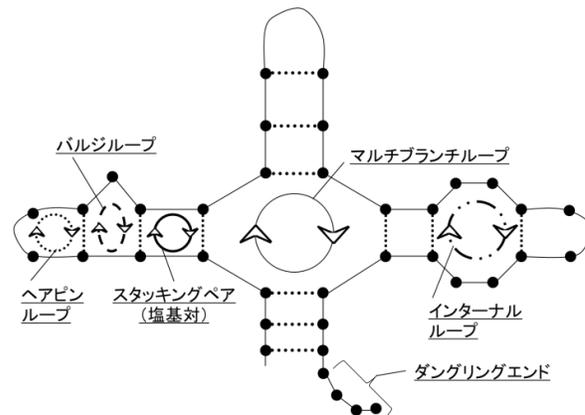
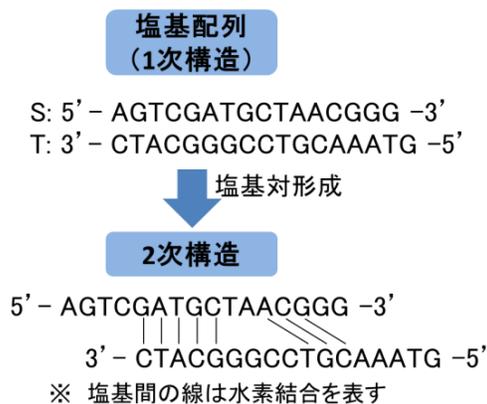
■ DNA の 2 次構造とは？

溶液中の DNA は様々な構造を形成している。これは、水素結合によって相補的な塩基同士が結合し、複数の塩基対を形成しているためである (☞ 41)。このとき、「DNA の塩基配列上のどの塩基とどの塩基が塩基対を作っているか」という情報で定義された構造を、DNA の 2 次構造と呼ぶ (下図)。

十分な場合が多く、それ以上の高次な構造を考える場合でも、2 次構造を考慮した上でのことになるだろう (☞ コラム タンパク質の構造)。

■ 2 次構造の種類

2 次構造は、その形によって様々な名前が付けられている (下図)。



DNA S の i 番目の塩基を s_i ,
DNA T の j 番目の塩基を t_j とすると、
上記の 2 次構造は、
以下の塩基対の集合で表される

- $(s_5, t_1), (s_6, t_2), (s_7, t_3), (s_8, t_4), (s_9, t_5),$
 $(s_{12}, t_{10}), (s_{13}, t_{11}), (s_{14}, t_{12})$

2 次構造は、1 本の DNA で形成される場合もあるし、複数本の DNA で形成される場合もある。ただし、塩基対は 2 つの塩基間で形成されているものとする。実際には、3 つの塩基が通常とは異なるタイプの水素結合を形成して 3 本鎖になったり、塩基対同士が相互作用したり、ということが起こり得るので、2 次構造で DNA の構造全てを網羅しているわけではない。しかし、実用的なレベルでは 2 次構造で

各構造は、以下のように簡略的に説明できる。

- **ダングリングエンド**：DNA 鎖の端にある、水素結合していない一本鎖部分。
- **ヘアピンループ**：ヘアピンのような形をしているループ構造。ループの中を一周したとき、塩基対を一つだけ含む。
- **スタッキングペア**：塩基対が隣接して並んでいる構造。
- **バルジループ**：片側の DNA 鎖にのみ、ループが存在する構造。バルジとは、出っ張り、ふくらみの意味。ループの中を一周したとき、塩基対を二つ含む。
- **インターナルループ**：両側の DNA 鎖にループ

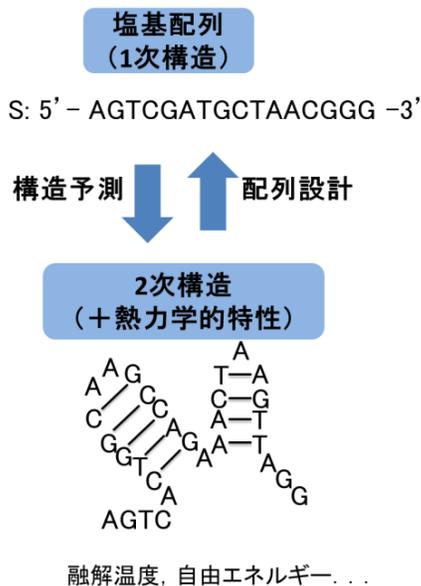
が存在する構造。ループの中を一周したとき、塩基対を二つ含む。

- ・ **マルチブランチループ**：構造が 3 方向以上に枝分かれした構造。ループの中を一周したとき、塩基対を三つ以上含む。

ここでは述べないが、上記の他に、シュードノットと呼ばれる構造もある。上記構造の厳密な定義を含め、詳細な説明に関しては、[1]等の書籍を参照されたい。

■ 2次構造の予測と設計

DNA を分子ロボットの部品として利用する際、それを自在に操るためには、2 つの技術が必要となる(下図)。



一つは、ある塩基配列 (の集合) が与えられたとき、それらが溶液中でどのような構造を取り、また、それがどの位安定なのかを予測する技術である。これを、DNA の 2 次構造予測と呼ぶ (☞ 63)。もう一つは、作りたい構造を与えられたとき、そのような構造を取りうる DNA の配列を決定する技術である。これを、DNA の配列設計と呼ぶ (☞ 64)。両者とも

DNA の化学反応を制御するために必須の基盤的技術であるので、詳細について各節を参照されたい。

コラム タンパク質の構造

タンパク質も DNA と同様に生体中で多様な構造を形成している。いや、その複雑性たるや、DNA の比ではないだろう。タンパク質は、水素結合だけでなく、イオン結合や疎水結合等の力が複雑に働くことによって、3 次、4 次の構造を形成している。DNA では 2 次構造を考慮すればそれで済む場合が多いが、タンパク質では更に 3 次以上の構造まで考慮する場合がほとんどである。

ここで、生体部品をロボットのパーツとしてみなすと、なぜ、プログラム可能な部品として、タンパク質ではなく、DNA が盛んに使われているのかが分かる。

ロボットのようなシステムを作る場合、パーツを意図通りに組み立て、動かすことが必須となるが、タンパク質の場合、その構造を予測することが非常に難しく、それゆえに設計も困難を極めるのである。

ただし、これは現在の科学技術の限界であって、将来、タンパク質の挙動を正確に予測し、自由自在に設計できる日が来るのかもしれない。タンパク質は DNA に無い多様な機能を備えており、もしタンパク質を思い通りに組み立て・操ることができたならば、非常に有用な生体ロボットが実現されるだろう。

参考文献

- [1] 小宮健他, DNA ナノエンジニアリング(2011/5), 近代科学社, ISBN-13: 978-4764904026

田中文昭 (産業技術総合研究所)

44. DNA 合成法

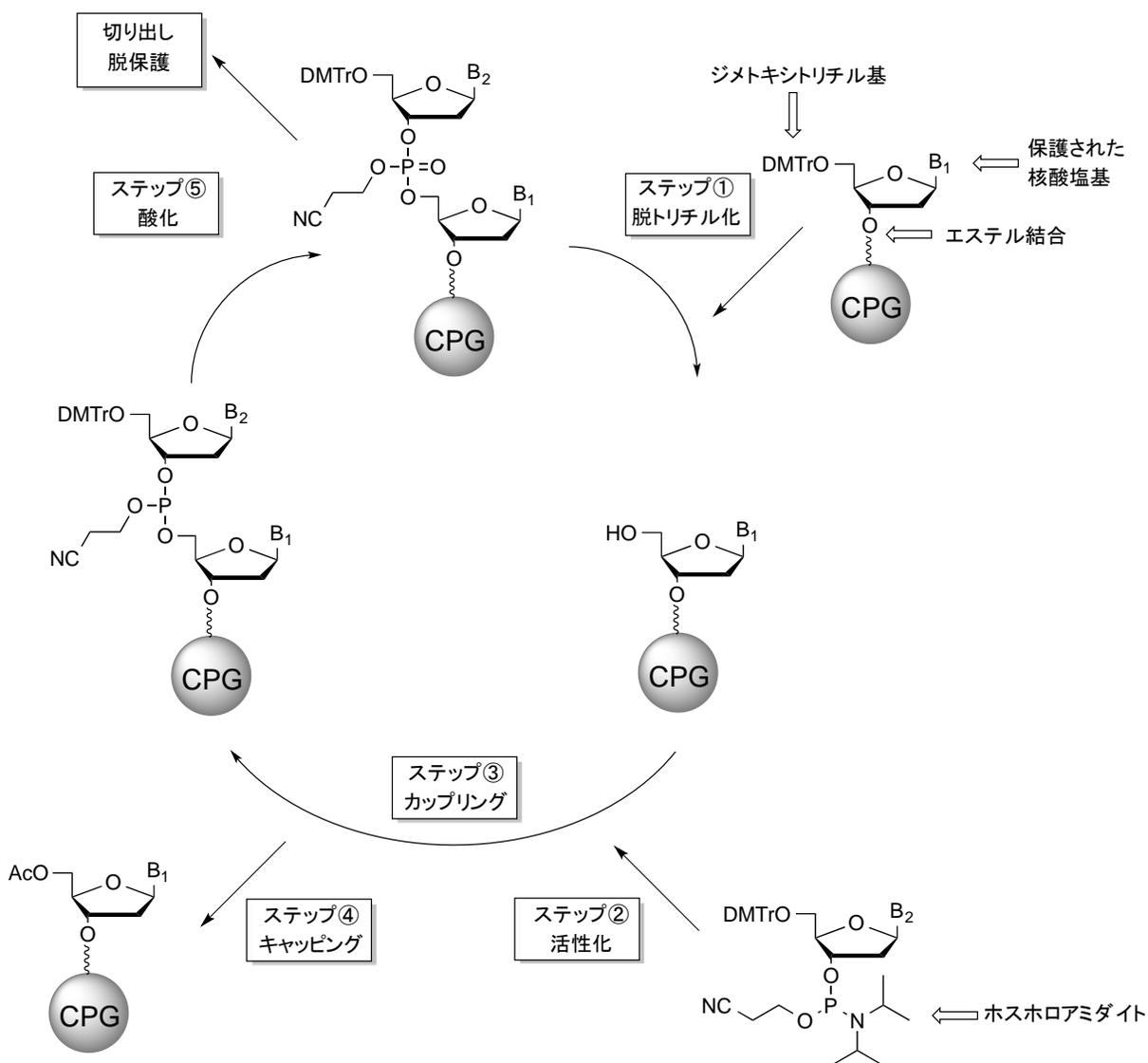
生命化学分野でのゲノム配列の解読や、犯罪捜査における DNA 鑑定、医療分野におけるウイルス型の診断、さらにはバイオテクノロジー全般の、遺伝子が関連する実験・操作のほぼ全てにおいて、化学合成した DNA が無くてはならない役割を果たしている。

■ ホスホロアミダイト法

今日広く用いられている DNA の化学合成法は、ホスホロアミダイト固相合成法である。この方法は、固相担体（Controlled Pore Glass カラム）にエステル結合で固定された一塩基めの DNA を出発物として、順次 5'-方向にモノマーを一塩基ずつ連結していく。使用するモノマーはリン酸ジエステルになる部

分の化学構造から、「ホスホロアミダイトモノマー」と呼ばれており、核酸塩基部、デオキシリボースの 5' 水酸基、ホスホロアミダイト部などに様々な保護基が導入されている。

ホスホロアミダイト法は、下図のように、全部で 6 つの反応ステップから成り立っている。



・ステップ① 脱トリチル化

CPG カラムの一塩基目、およびホスホロアミダイトモノマーのいずれにも、5'の水酸基はジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護されている。反応スキームをよく見ると、伸びていく DNA の 5'末端は、カップリング時を除いて常に DMTr 基になっていることがわかるだろう。これを酸 (3%トリクロロ酢酸/ジクロロメタン) で除去し、次の反応点となる 5'水酸基を露出させるのが、このステップだ。

・ステップ② 活性化

脱トリチル化で生じた 5'水酸基と連結するために、ホスホロアミダイト部の反応性を高めるステップ。具体的には 1-テトラゾールなどの活性化剤をホスホロアミダイトモノマーの溶液と混合する。

・ステップ③ カップリング

活性化されたホスホロアミダイトモノマーを CPG カラム内に流し、実際に 5'水酸基との連結反応を行う。

・ステップ④ キャッピング

反応が問題なく進行すれば、出発物の 99%近くは一塩基伸張している (すなわち 5'末端にはホスホロアミダイトモノマー由来の DMTr 基がついている) はずであるが、未反応で残った 1%の出発物の 5'末端は水酸基のままである。これを放っておくと、次のカップリング時に、ここにもホスホロアミダイトモノマーが結合し、一塩基抜けた副産物ができてしまう。これを防ぐために、無水酢酸で未反応の 5'水酸基をつぶしてしまう。

・ステップ⑤ 酸化

ホスホロアミダイトモノマー由来のリンは三価の状態なので、これを酸化して、五価のリン酸ジエステルにする。

この後は、配列に必要な塩基の数だけ、ステップ①～⑤を繰り返す。全ての塩基を連結し終わったら、最終ステップを行う。

・最終ステップ 切り出し・脱保護

CPG カラムに濃アンモニア水を通して、室温で一

時間おくと、固相担体と一塩基目の間のエステル結合が切断されて、DNA 産物が濃アンモニア水に溶け出してくる。ホスホロアミダイトモノマーに導入されていた保護基は DMTr 基を除いて全て塩基性で除去されるように設計されているため、この濃アンモニア水溶液をそのまま 55°C で 16 時間加熱することで、DMTr 基を除く全ての保護基が脱保護される。

この後は、DNA 精製専用の簡易精製カラムで脱塩と DMTr 基の除去を行う (☞ 78)。

コラム 水気厳禁!

ホスホロアミダイト法で注意が必要なのは、ステップ②とステップ③の反応が非常に水を嫌うことだ。水は 5'水酸基とホスホロアミダイトとの連結を競争的に阻害するので、このステップでは極力排除しなければならない。自動合成機にとりつける試薬は、容易に湿気を吸うので、外気に長時間触れさせないようにすることが必要だ。

雨の日には DNA 合成をしない方が良く、というジンクスがある研究室もあるとかないとか。DNA 受託合成会社が、梅雨の無い北海道に多いのもこれが一因らしい...

■ DNA 自動合成機

上述の反応を、全て自動で行ってくれる便利な機械が DNA 自動合成機だ。以前は ABI 社の DNA 自動合成機が広く普及していたが、現在では生産中止になってしまった。修理部品も手に入りにくい状況なので、使用できる機会があったら、大事に扱おう。現在は日本テクノサービス社 (<http://www.ntsbio.com/synthesizer.htm>) が同等品を販売している。海外では、最大 192 本の DNA を同時に合成できる機械を販売している会社 (<http://bioautomation.com>) もある。これがなければ大量のステーブルを使用する DNA オリガミは生まれなかつただろう。

参考文献

[1] 有機化学実験の手引き 4, 化学同人

葛谷明紀 (関西大学)



DNA Mag-beads 東京大学（駒場）2014 年

第 5 章

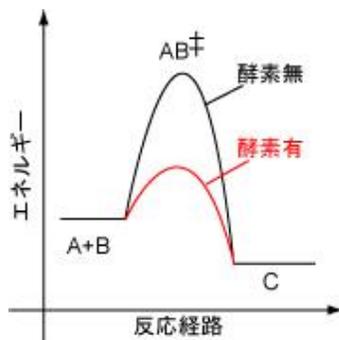
DNA をパワーアップする飛び道具たち

45. いろいろな酵素

酵素は、化学反応を触媒するものであり、蛋白質や核酸から主になる。ATP や GTP といったヌクレオチド・エネルギー源を使う物と、ヌクレオチド非依存的な酵素があり、非常に高効率に化学反応を触媒する。本章では、様々な酵素を概説する。

■ 酵素について

原料 A と B が遷移状態 AB^\ddagger を経て生成物 C を作成する反応を考える。酵素は遷移状態を安定化させること(遷移状態のエネルギー低下)によって、反応を促進している。



■ ミカエリスメンテンの式

その際、原料 A や B を酵素 E(=Enzyme)の基質 S(=Substrate)と呼び、生成物 C を P(=Product)と呼ぶ。これらを用いて速度式を書く下記になる。



ここで、前半の $E+S \rightleftharpoons ES$ の反応はすぐに化学平衡に達すると仮定すると、後半の $ES \rightarrow E+P$ の反応が律速段階と考える事ができる。そこで、解離定数を $K_s(=[E][S]/[ES])$ 式①)とし、全酵素濃度 $[E]_0$ を $[E]_0=[E]+[ES]$ (式②)とし、式②を式①に代入すると、以下の式を得る。

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_s + [S]} \quad \text{式③}$$

ここで、生成物の生成速度 v は下記のように書けるので、

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \quad \text{式④}$$

式③を式④に代入し、 $V_{max}=k_{+2}[E]_0$ とすると、以下の良く知られたミカエリスメンテンの式が得られる。

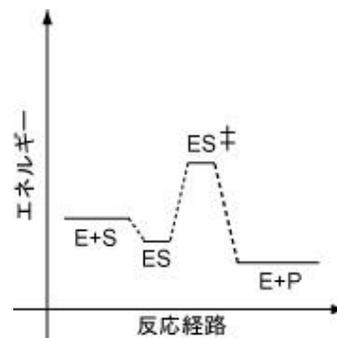
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S]} \quad \text{式⑤}$$

上記式⑤は後半の $ES \rightarrow E+P$ が律速の場合($k_{-1} \gg k_{+2}$ の場合)であるが、定常状態を仮定できる場合も同様に導出可能である。この場合は、式⑤において、 K_s が下記 K_m となる(ちなみに、 $k_{-1} \gg k_{+2}$ の場合は、式⑥において、 k_{+2} が無視できるので、 $K_m=K_s$ となる)。

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad \text{式⑥}$$

■ 速度論的パラメーターと熱力学の関係

エネルギー状態の変化を E, S, P で書き直してみると、下記ようになる。



前半の $E+S \rightleftharpoons ES$ のエネルギー変化 dG^0 は負の値であり、前述の K_m とかかわりがある。その次の $ES \rightarrow ES^\ddagger$ のエネルギー変化 dG^\ddagger は正の値であり、前述の k_{+2} とかかわりがある。酵素は遷移状態 ES^\ddagger を安定化(エネルギー低下)する事で反応を促進している。その結果、この2つのエネルギー変化の総和 $dGT^\ddagger = dG^0 + dG^\ddagger$ が全体の反応速度に重要であり、酵素反応によって、様々な値を取る。

■ BIOMOD で登場する様々な酵素

BIOMOD では、核酸を基本材料として用いているため、核酸を加工する酵素を利用する。以下では、増幅酵素(ポリメラーゼ)、切断酵素(制限酵素、ヌクレアーゼ)、結合酵素(ライガーゼ)といった良く登場する酵素を概説する。詳細は後述の章を参照の事。

■ ポリメラーゼ

DNA や RNA を鋳型に DNA や RNA といった核酸高分子を作成する酵素。

DNA を合成する DNA ポリメラーゼは DNA 鎖の 3' 末端の OH 基(水酸基)に、ヌクレオチドを付加する(5' → 3' 方向に新生鎖は伸張する)。合成開始には、プライマーと呼ばれる配列が必要である。

RNA を合成する RNA ポリメラーゼは DNA を鋳型とする物、RNA を鋳型とする物、鋳型を必要としない物(mRNA の 3' 末端に polyA 配列を付加する poly(A) ポリメラーゼ等)がある。

また、最近では人工核酸を合成したり、あるいは、人工核酸を鋳型に天然核酸を合成する物もある。

■ 制限酵素

ある認識配列を認識し、その認識配列内部、あるいは付近の配列を切断する。切断断片は、末端形状により、両鎖の端が揃っている平滑末端と、片鎖が突出している粘着末端がある。通常使われるのは II 型制限酵素と呼ばれる物であり、認識配列は回分(パリンδροーム)になっている(片鎖の 5' 側から読んでも、あるいは、その相補配列の 5' 側から読んでも同じ配

列)。

■ ヌクレアーゼ

糖とリン酸間のホスホジエステル結合を加水分解する酵素。核酸配列の内部(endo-)で切断するエンドヌクレアーゼと、外部(末端: exo-)で切断するエキソヌクレアーゼがある。

■ リガーゼ

核酸の末端同士をリン酸ジエステル結合でつなぐ。核酸を切り貼りする際に貼る過程に使われる。

参考文献

- [1] Essential 細胞生物学 原書第 3 版 南江堂 (2011/2/25); A. Bruce et al(著), 中村桂子/松原謙一(翻訳); ISBN-13: 978-4524262144
- [2] 生命科学のための物理化学〈上〉 培風館 (1988/03); D. アイゼンバーグ(著), D. クロサーズ(著), 西本吉助(翻訳), 影本彰弘(翻訳); ISBN-13: 978-4563045036

多田隈尚史 (京都大学)

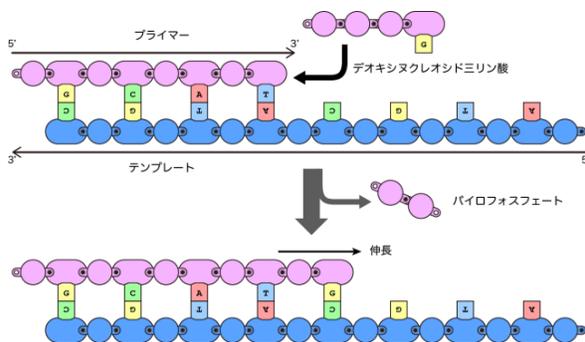
46. ポリメラーゼ反応

DNA コンピューティングや構造の作製時に用いられる酵素のなかでも、制限酵素について使われる機会が多い反応が、このポリメラーゼ反応だろう。ここでは、ポリメラーゼを複製のツールとしてみたときにどのようなものがあるのかを概観するとともに、これを用いた複製の例として PCR 法を紹介する。

■ DNA ポリメラーゼ

酵素反応は、核酸を材料としたエンジニアリングのなかでも、対象となる DNA/RNA 自体を操作・加工できるツールとして重要なものである。各種 DNA コンピューティング反応の実装や、DNA ハイドロゲルの形成など、酵素反応がその設計の鍵として用いられている例は数多い。ここではそのうちの「コピー」をつかさどる、ポリメラーゼと呼ばれる酵素について、これを工学的に利用する視点から解説する。(ポリメラーゼの構造や機構そのものについては、理学的な興味からこれまでもたくさんの研究がされてきているが、本項では解説しない。)

DNA ポリメラーゼは、その名のとおりに、DNA を伸長 (polymerase) する酵素である。テンプレートとなる DNA に対して、その相補となるプライマー DNA を起点に、相補配列の DNA を 5'末端から 3'末端方向にヌクレオチドを合成していく。このとき、溶液中の dNTP (デオキシヌクレオシド三リン酸) のうち、1 塩基ごとに対応するもの (dATP, dTTP, dCTP, dGTP のうちのどれか) が基質として消費されていく。



[2]を参考に作成

ひとことで DNA ポリメラーゼといっても、実は

その種類にはたくさんある。たとえば、主要メーカーのひとつである NEB (New England Biolabs) が現在販売している DNA ポリメラーゼは、カタログによれば 25 種類にも及ぶ[1]。それぞれの特徴に違いがあるわけだが、その比較をするうえで知っておくと良いパラメータのうち、いくつかについて以下に紹介する：

・**3'→5'エクソヌクレアーゼ活性** エクソヌクレアーゼ活性とは、DNA を端から 1 塩基ずつ分解することができる能力のことである。この場合、3'側から 5'側に分解できることを意味する。伸長させる機能を持つ一方で分解する能力も有する、というのはいささか相反しているように思えるかもしれないが、じつはこれは複製の校正をするうえでは重要な意味を持っている。正しくない塩基が合成された場合、この機能によってその塩基を取り外し、あらためてその箇所の合成をおこなうことができる。

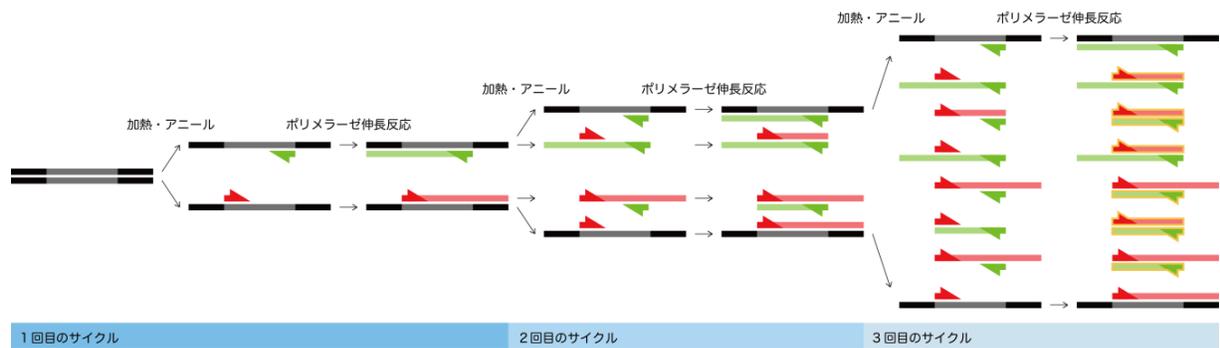
・**5'→3'エクソヌクレアーゼ活性** 同様に、5'側から 3'側に分解していくことができる。

・**鎖置換 (strand displacement) 能** 5'側から伸長を進めていった先に、すでに相補となる DNA がハイブリダイズしていた場合、これを引き剥がして合成を進めることができる能力。

・**耐熱性** 通常、タンパク質は高温にすると変性してしまい、その機能を失ってしまう (失活) ことがおおい。高温にしても、その活性を維持できる耐熱性の DNA ポリメラーゼが発見され、これを利用することで、後述の PCR 法が格段に楽になった。

たとえば、この本の中で使われている DNA ポリメラーゼの場合、NEB によれば[1]下記のような特徴を持つ。

Bst DNA Polymerase, Large Fragment (DNA Toolbox で使用)
3'→5' Exonuclease: -



[2]を参考に作成

5'→3' Exonuclease: -

Strand Displacement: +++++

Thermal Stability: +

Phi29 DNA Polymerase (DNA 物理ハイドロゲルの形成で使用)

3'→5' Exonuclease: +++++

5'→3' Exonuclease: -

Strand Displacement: +++++

Thermal Stability: -

Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (PCR法で利用)

3'→5' Exonuclease: -

5'→3' Exonuclease: +

Strand Displacement: +*

Thermal Stability: ++

注: -はその能力を持たない, +の数でその能力の高さを表している。

(* 置換された DNA 鎖は分解される)

コラム PCR 法

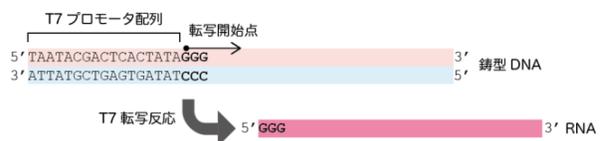
DNA ポリメラーゼを使った反応のなかでも、最もよく知られているのがこの PCR 法である (上図)。

2 本鎖 DNA の指定した領域を増幅することができる。まず、対象となる二本鎖 DNA を水溶液中で加熱して一本鎖 DNA にする。溶液中には事前に増幅したい箇所を指定するプライマー (図中の緑・赤矢印) が大量に入れられており、アニーリングをすることでそのプライマーがハイブリダイゼーションする。この状態で DNA ポリメラーゼは伸長を開始し、相補となる DNA がそれぞれ (薄緑・薄赤) 合成される。ここで再び高温にして一本鎖 DNA の状態に戻し、再度アニーリングをおこなうと、さきほど合成された DNA にもプライマーがハイブリダイゼーションし、次の伸長反応がすすむ。このサイクルを繰り返すことで、図中の黄色で示されているように、望みの領域のみをもった二本鎖 DNA が指数関数的に複製されることになる。耐熱性のある DNA ポリメラーゼが用いられるようになったことで、サイクルごとに酵素を補充する必要がなくなった。

■ RNA ポリメラーゼ

RNA ポリメラーゼは、生物システムでは転写装置としての役割を果たす重要な酵素である。とくに、DNA を鋳型としてその相補となる RNA 鎖を合成するものを、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼという。

RNA ポリメラーゼのなかでも代表的なものが、T7RNA ポリメラーゼとよばれる酵素である。T7RNA ポリメラーゼは、下図のように、T7 プロモーター配列とよばれる特定の「開始配列」をもった二本鎖 DNA を鋳型として、そこから 3' 方向に進み、NTP (ヌクレオシド三リン酸) を基質としながら RNA を合成する。DNA/RNA ナノテクノロジーや DNA コンピューティングの分野でもこの酵素はよく用いられており、たとえば RNA タイル[3,4]や RTRACS[4]といった反応系に利用されている。



参考文献

[1] DNA Polymerase Selection Chart

<https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/dna-polymerase-selection-chart>

[2] Alberts, B. et al. *The Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition. Garland Science (2002)

[3] Geary, C., Rothmund, P. W. K., & Andersen, E. S. (2014). A single-stranded architecture for cotranscriptional folding of RNA nanostructures. *Science*, *345*(6198), 799–804.

[4] Yu, J., Liu, Z., Jiang, W., Wang, G., & Mao, C. (2015). De novo design of an RNA tile that self-assembles into a homo-octameric nanoprism. *Nature Communications*, *6*, 5724.

[5] Ayukawa, S., Takinoue, M., & Kiga, D. (2011). RTRACS: A Modularized RNA-Dependent RNA Transcription System with High Programmability. *Acc. Chem. Res.*, *44*(12), 1369–1379.

浜田省吾 (コーネル大学)

47. いろいろな制限酵素

制限酵素は、ある認識配列を認識し、その認識配列内部、あるいは付近の配列を切断する。BIOMOD では、DNA 材料の加工だけでなく、シグナルの算出等、システムを構成する部品としても用いられる。

■ 制限酵素について

制限酵素は第二次世界大戦後に研究の芽が出て、1970年代に基本的には完成された(1978年度に Smith, Arber と Nathans がノーベル生理学・医学賞を受賞)。

現象としては、1952年に Luria ら(イリノイ大学、大腸菌の培養に用いられる LB 培地を開発した)が、ある細菌株中で増殖したファージが、通常は感染するはずの菌株に何故か感染できなくなるという事を見出した。この現象は「宿主支配の制限 (restriction)」と呼ばれ、ある種の細菌株には、防御機構が備わっており、(自身の DNA は分解しないが)、ファージなどの異物 DNA を認識して分解する機構があるのではと考えられた。

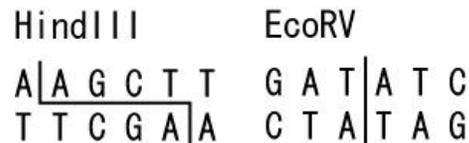
時は下って 1968 年に Yuan ら(ケンブリッジ大学)は、DNA を特異的に分解する『制限』酵素が大腸菌 K12 株にあると仮定し、精製を試み、I 型制限酵素を発見した。しかし、この I 型制限酵素は認識部位から 1 kbp 以上はなれた場所をランダムに切断するタイプであり、今日では遺伝子工学ツールとして用いられていない。

今日用いられている II 型制限酵素は 1968 年、Werner Arber(ジュネーブ大学)、Hamilton Othanel Smith ら(ジョンズ・ホプキンス大学)により提案・発見された。

■ DNA 加工のための制限酵素

切断断片は、末端形状により、両鎖の端が揃っている平滑末端と、片鎖が突出している粘着末端がある。通常使われるのは II 型制限酵素と呼ばれる物であり、認識配列は回分(パルンドローム)になっている。下に例を 3 つ示す。両方とも、片鎖の 5'側から読んでも、あるいは、その相補配列の 3'側から読んでも同じ配列になっている。左側の HindIII は粘着末端が生じ、

右側の EcoRV は平滑末端が生じる。



使用する際は塩濃度に気をつける。一般的な制限酵素は 1 価イオン(K⁺, Na⁺, Cl⁻, OAc⁻), 2 価イオン(Mg²⁺等), pH 依存的に活性が変わる。各社より、適切な buffer が販売されているので、自分が使用する酵素にあわせた buffer を用いる。複数酵素を組合せて使用する場合も各社より対応表やアプリが公開されているので、それらを用いる。また、最近では、酵素の遺伝子改良を通じて、同じ buffer で反応が進むように改良が加えられている。

反応の際は、各社から発表されているプロトコルに従って反応をさせれば問題ないが、酵素を過剰量加えすぎないように注意する。というのは、酵素は保存のため、50%グリセロール溶液に入っているが、グリセロールは酵素の認識特異性を下げ、目的の配列以外にも切断するようになる(star 活性)。こちらも最近では遺伝子改変を通して、star 活性の少ない物が発売されている。

■ シグナル生成因子としての制限酵素

BIOMOD では、複数の要素を組み合わせたシステムを構築する場合がある。その際に、特定の認識配列のみを切断する制限酵素は情報処理の際に便利なツールである。例えば、外部のシグナルを受けて、シグナルを生成するプロセスを考えると、シグナル刺激前は制限酵素を何らかの方法で不活性状態に保っておき(例えば、籠で囲う等の立体障害)、刺激が入ると、活性化状態になり、基質 DNA を切断する事で、

増幅された 2 次シグナルを放出させる事が可能となる。あるいは、トリガーの外部シグナルとして用いることも可能であろう。これらの用途で用いる際は、他の反応系(例えば、DNA 演算回路)と同じ buffer を用いても認識・切断活性があるかどうかを確認する必要がある(あるいは、同じ buffer で動作しそうな制限酵素を選ぶ)。

コラム ギブソン・アセンブリー

クレイグ・ヴェンター研究所の Daniel Gibson によって開発された手法。複数の DNA 断片を効率良く連結する手法であり、古典的な制限酵素と DNA リガーゼを用いた方法と比べて、短時間で操作回数少なくでき、また、制限酵素由来の余分な配列が残存しないという利点がある(余分な配列は活性に影響を与える場合があるので、余分な配列が残存しないという点は、蛋白質を発現させる際に重要である)。具体的には以下の 3 つの酵素を用いる(NEB からはキットも売っている: E2611S と L)。相補配列によるアニールと鎖間のギャップを埋めるという基本戦略は、制限酵素と DNA リガーゼのみを用いた方法と同じであるが、3 つの酵素のコンビネーションとする事で、one-pot で反応が効率的に進み、また、合成 DNA 断片を材料として用いることが可能となったので、近年は多用されている。

・ T5 エキソヌクレアーゼ

原料の 2 本鎖 DNA の末端を 5'末端から分解する事で、アニールに用いられる 1 本鎖共通配列を生じさせる。

・ 耐熱性 DNA ポリメラーゼ(Phusion polymerase 等)

アニールした DNA 間のギャップを埋めるべく、1 本鎖領域に相補鎖を合成する。

・ Taq リガーゼ

アニールした DNA 間のギャップはポリメラーゼが埋めてくれるが、最後にニックが残るので、この部分を連結させる。

コラム 遺伝子全合成

近年は DNA 合成の技術が進み、正確な DNA 合成が非常に安価となってきた。このため、従来は難しかった長鎖の合成も現実的となってきた。具体的には、生物は 10^{-6} ~ 10^{-7} の正確性で DNA を合成できるが、化学合成も 10^{-2} ~ 10^{-3} 程度の正確性が可能となってきた。このため、200bp 程度の DNA 合成の商用サービスが提供されている(IDT 社等)。また、これらの化学合成 DNA をつなげたり、天然の酵素反応と組み合わせることで、10kbp を超える人工遺伝子サービスも広く利用されるようになってきた。これらのサービスでは、web ページやメールで配列情報を送るだけで、数日から数週間で目的配列の DNA が届く。このため、制限酵素やリガーゼを用いて遺伝子操作をする代わりに、発注するだけで目的 DNA を得る事が可能となってきた。価格も安価になってきたので、生物系ではない BIOMODer には、朗報かもしれない。

参考文献

- [1] 人工生命—遺伝子工学の誕生 (1984/11) J・チャーファス (著), 鈴木 之 (翻訳)
- [2] Gibson; et al. "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases". Nature Methods (2009); 6 (5): 343-345. doi:10.1038/nmeth.1318. PMID 19363495.
- [3] IDT 社, テクニカルレポート” Ultramer Oligonucleotides”

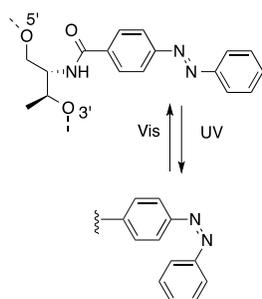
多田隈尚史 (京都大学)

48. いろいろな人工塩基

DNA の化学合成法 (⇒ 44) が発展した 1980 年代以降から, 世界中で天然に無い優れた機能をもつ人工核酸塩基の開発が競われた. この分野では, 日本の研究者も大いに活躍している. 本稿では, 既に市販されており BIOMOD のプロジェクトでも使えるユニークな機能を持った人工塩基をいくつか紹介する.

■ 光スイッチ アゾベンゼン [1]

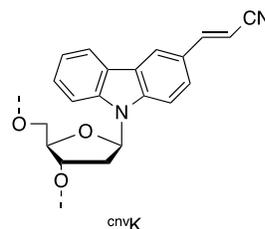
名古屋大学の浅沼浩之教授, 中国海洋大学の梁興国教授らによって開発された, DNA の二重らせんの形成-解離を光でスイッチできる人工塩基.



このアゾベンゼン残基は, 300~400 nm の長波長の紫外光を吸収すると, 図上のトランス体からシス体に, >400 nm の可視光を吸収するとシス体からトランス体に光異性化するユニークな特長を持っている. 通常のトランス体は平面構造をしているため, DNA の塩基対間に挿入されて DNA 二重らせんを安定化するが, シス体はベンゼン環同士の立体反発により若干ねじれたかさ高い構造をしており, DNA 二重らせんを大きく不安定化する. この違いを利用して, 紫外光照射で DNA 二重らせんを選択的に解離, 可視光照射によって選択的に形成, というコントロールが可能になる. 異性化率が 100%ではないので, 1 残基入ただけでは効果は小さいが, なんと 1 塩基おきに多数挿入してもトランス体では二重らせんを大きく安定化し, シス体に異性化させると今度は大きく不安定化するという, 不思議な性質も持っている. 予算が許すなら, 複数分子組み込もう.

■ 光架橋人工塩基 ^{CNVK} [2]

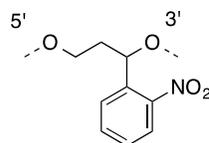
北陸先端大学院大学の藤本健造教授らによって開発された, 光を当てると DNA 二重らせんを共有結合で固定できる人工塩基.



これを鎖中に組み込むと, 366 nm の紫外光照射により相補鎖に組み込んだ T と 1 秒で共有結合が形成され, 二本の鎖がつながって離れなくなる. 切り離したい時には, 312 nm の光を照射するだけで良い. 効率よく連結するためには, 相補鎖中の ^{CNVK} の正面もしくは隣接する塩基が T であることが望ましい. うまく配列を設計しよう.

■ 光開裂性リンカー PC リンカー [3]

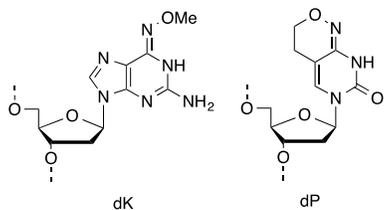
光で制御できる人工塩基としては, 他にも光で DNA 鎖を切断できる Photocleavable (PC) linker も利用できる.



このリンカーを DNA の主鎖に挿入しておくと, トランスイルミネーターやハンディーUV ランプの長波長 UV (>300 nm) をあてるだけで, 速やかに主鎖が切断される. 反応後の断片の末端は, PC リンカーの 3'-側の断片も, 5'-側の断片もどちらもリン酸モノエステルになる. 従って, 5'-側の断片はそのままでは他の断片とライゲーションできないので, 脱リン酸化を行わなければならない点に注意.

■ ユニバーサル塩基 dK と dP [4]

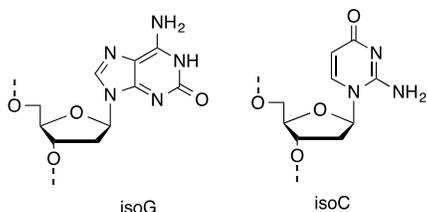
核酸塩基の互変異性をうまく利用して, 複数種の塩基と塩基対形成できる人工塩基も開発されている.



dK は A や G の類縁体で、T とも C とも同じように、安定な塩基対を形成できる。同様に、dP は、A とも G とも塩基対形成する。

■ 人工塩基対 isoG-isoC ペア [5]

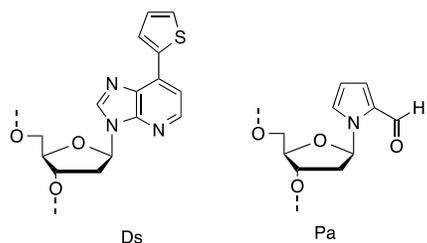
A-T ペア、G-C ペアに続く、世界で初めての第三の塩基対として元フロリダ大学の Benner らによって開発された人工塩基対。



天然の G、C と比較すると、ちょうど置換基のアミノ基とカルボニル基の位置がどちらも逆さまになっている。ポリメラーゼなどの酵素にはあまり正確に認識されないが、通常の DNA 計算で使用するには十分、第三の塩基対として使えるだろう。

■ 人工塩基対 Ds-Pa ペア [5]

理化学研究所の平尾一郎研究員らによって開発された、こちらも第三の塩基対。



なんと塩基対形成に水素結合を使わず、形がフィットすることだけを利用していながら、酵素にも認識されて正確に複製できるすぐれものだ。

参考文献

- [1] Y. Kamiya, H. Asanuma, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1663-1672.
 [2] Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett.* **2008**, *10*,

3227-3230.

[3] P. Ordoukhanian, J. Taylor *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9570-9571.

[4] P. Kong Thoo Lin, D. M. Brown, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5149-5152.

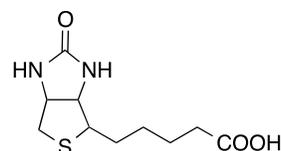
[5] 「人工塩基対の分子設計」, 平尾一郎, TCI メール, 2010, No. 148

コラム

便利なビオチン-ストレプトアビジン相互作用

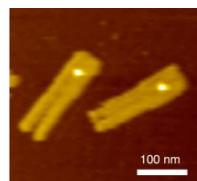
生化学の分野で最も広く使われているタンパクの一つが、ストレプトアビジンだ。同じサブユニットが4つ会合してできているこのタンパクは、ビオチン(ビタミンB7)という化合物と、非常に強固(生物界では最強)に結合する性質があり、酵素などを固定化する際などに多用されている。

DNA 合成で使用するためのビオチンアミダイトももちろん市販されており、DNA の 5'-末端, 3'-末端, あるいは鎖の中であっても、自在に導入できるようになっている。



ビオチンの化学構造。側鎖のカルボン酸を介して様々な分子と連結できる。

DNA ナノテクノロジー研究においても、マイカに非特異吸着しない、DNA より高い 5 nm の光点として観察できる、などの長所がたくさんあり、当研究室では、「困ったときのストレプトアビジン」が合い言葉になっているほど、なじみのあるタンパクだ。



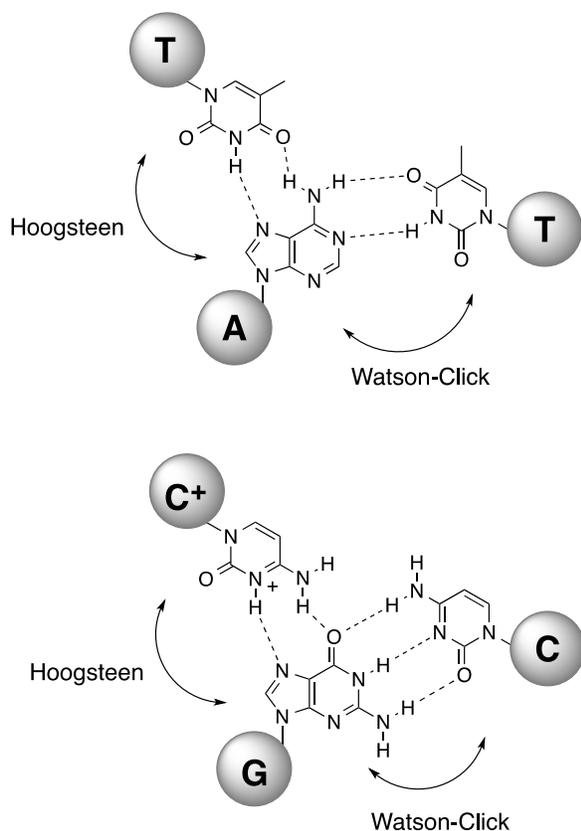
ストレプトアビジン(明るい点)を摘んで閉じた DNA ペンチ

葛谷明紀(関西大学)

49. 非ワトソンクリック構造

DNA の相補性の源である A-T および G-C ペアは、発見者にちなんで、ワトソン-クリック塩基対と呼ばれている。自然界に存在する DNA のほとんどは、このワトソン-クリック塩基対を使って二重らせんを形成しているが、一部には、三重らせんや、四重らせんを形成する DNA まで見つかっている。

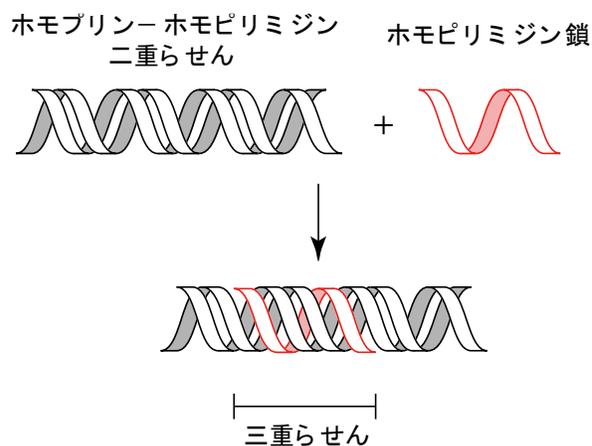
プリン塩基のイミノプロトン（1 位）の側から塩基対形成するワトソン-クリック塩基対以外にも、2 位、7 位の側から塩基対形成するフーグスティーン（Hoogsteen）結合が知られている。A-T ペアには、T がフーグスティーン結合し、G-C ペアには、プロトネーションした C⁺が結合する。



■ DNA 三重らせん (DNA triplex) [1]

上図を眺めていると気がつくだろうが、プリン-ピリミジンの通常のワトソン-クリック塩基対にフーグスティーン結合する塩基はどちらもピリミジンである。これを反映して、自然界には二重らせんのホモプリン-ホモピリミジン領域（片方の鎖にプリンもしくはピリミジンが連続で続いている配列、例えば

AAAAAAAA/TTTTTTTT）に、第三の鎖としてホモピリミジン鎖（TTTTTTTT）がフーグスティーン結合してできる DNA 三重らせんが見つかっており、これが遺伝子の発現調節に関わっている可能性が示唆されている。



二種類のトリプレット (triplet, 三塩基の組み合わせ) のうち、T-A-T トリプレットはどのような条件でも形成可能だが、プロトネーションした C⁺が必要な C⁺-G-C トリプレットは、C⁺ができる酸性条件でしか形成できない。

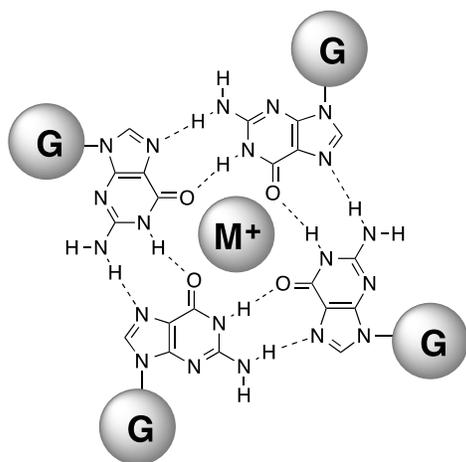
一般に、三本めの鎖の結合の方が、二重鎖の形成よりも不安定なため、三重らせんの UV 融解曲線(82)を測定すると、二段階の融解が観察される。

いずれにせよ、あまり安定性の高くない三重らせんを BIOMOD プロジェクトで積極的に利用する機会は少ないかもしれないが、DNA の配列を設計する際に、プリンやピリミジンが連続する配列はなるべく避けた方が無難だろう。

■ グアニン四重鎖 (G quadruplex) [2]

自然界には、さらに鎖の本数が多い DNA 四重鎖も見つかっている。特に有名なものが、グアニン四重

鎖だ。



これは、金属イオンを中心に配位して四塩基のグアニンが全てフーグスティーン結合してできる G カルテット (quartet) 構造に由来している。真ん中にトラップされる金属イオンは主に Na^+ と K^+ で、 K^+ の方がより強く結合する。

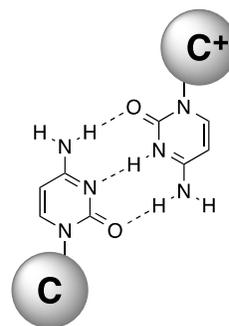
一般に、G が三塩基以上連続する配列があるところの構造をとり易くなる。生体内では特に、染色体の末端領域であるテロメア領域に G の繰り返し配列が多く (例えばヒトのゲノムの場合、TTAGGG が何度も繰り返している)、この末端一本鎖領域における四重鎖構造の形成が、染色体そのものの安定性に寄与しているのではないかと推定されている。

グアニン四重鎖の安定性は、通常の DNA 二重らせんよりも高いことが多いので、配列設計の際には、G が三塩基以上連続しないように注意すべきだ。一本鎖中に G の連続配列が多数存在すると、分子内で複雑に折り畳まれて安定な四重鎖を形成することもある。例えば、同じ配列が 4 回繰り返した (TTAGGG)₄ という鎖は、様々な折り畳まれ方で分子内四重鎖を形成することが知られている。

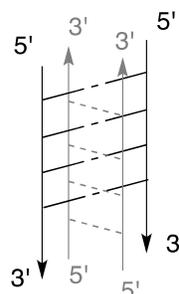
逆に、グアニン四重鎖を積極的に利用すれば、 Na^+ や K^+ をトリガーとする DNA 分子マシンを作ることでもできる。例えば DNA ペンチのレバー部に (TTAGGG)₂ を複数導入すれば、 Na^+ や K^+ を検知して DNA ペンチが閉じる単分子金属イオンセンサーをつくることできる (☞ 26)。

■ アイモチーフ (i-motif) [3]

DNA 4 重鎖としては、他にもアイモチーフ (i-motif) 構造と呼ばれるものも知られている。こちらはフーグスティーン結合は使用せず、C と、プロトネーションした C^+ とのミスマッチ塩基対に由来する構造である。



C-C⁺塩基対では二本鎖にしかならないが、i-motif は非常にユニークな構造で形成される。すなわち、上記の C-C⁺塩基対で形成される二本鎖が二つ、一段ずつ互い違いにかみ合いながら反対向きに結合するのだ。



C⁺-G-C トリプレット同様、C のプロトネーションが必須なので、i-motif は酸性条件でしか形成されない。このため、i-motif を使った pH 応答性の DNA 分子マシンも、すでにいくつか報告されている。

参考文献

- [1] M. D. Frank-Kamenetskii, S. M. Mirkin, *Ann. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 65-95.
- [2] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Niedle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402-5415.
- [3] Y. C. Dong, Z. Q. Yang, D. S. Liu, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1853-1860.

葛谷明紀 (関西大学)

50. タンパク質モーター

タンパク質モーターとは、生体内のエネルギー通貨であるアデノシン三リン酸(ATP)の加水分解反応による化学エネルギーを運動エネルギーに変換するタンパク質である。アクチン上を運動し、筋収縮に関与するミオシンや、微小管上を運動し、細胞内での輸送小胞やオルガネラの運搬に関与するキネシンなどが知られている。

■ ミオシンの構造と機能

筋肉のおもな機能は、力を発生して身体を動かすことである。この収縮力の源は おもにミオシンとアクチンと呼ばれる 2 種類のタンパク質である。

ミオシンは分子量 520,000 のタンパク質であり、アクチンとの結合部位やATP加水分解部位を含む頭部と自己組織的にフィラメントを形成する尾部などを含む(図 1(A))。アクチンフィラメントは、分子量が約 42,000 の球形(G)アクチンが、約 13 個で半周期構造となる右巻き二重らせん構造の線維状重合体である(図 1(B))。G-アクチンは 4 つのサブドメインから形成され、それらのサイズの違いによりアクチンフィラメントには極性が存在する。ミオシンはアクチンをマイナス端方向へと移動させることで筋収縮を起こす。

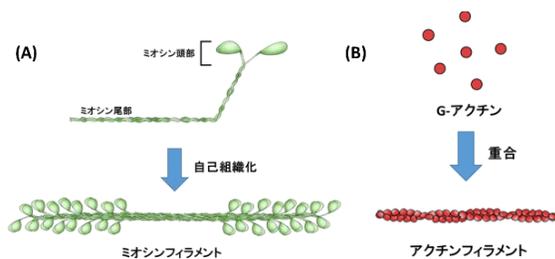


図 1 (A)アクチンおよび(B)ミオシンの構造

■ 筋収縮の分子メカニズム

ミオシン、アクチンによる収縮のメカニズムとしてミオシンが頭部先端をアクチンに結合させ、その角度を変化させることで力を発生しているとする首振り説が提唱された。この仮説は X 線結晶構造解析や光ピンセット法を中心に検証されてきた。光ピンセットを用いた計測によりミオシンのステップサイズは 9~13 nm であることが明らかとされた。その後、ガラスニードルを用いたミオシンの変位計測により、ミオシンは 5.5 nm 間隔のアクチンピッチ上を複数

回移動する様式でステップを発生させることが明らかとされた。さらにミオシンの 1 分子計測において外部負荷を変化させることにより、ミオシンのステップサイズは負荷の増加に伴い減少する、負荷依存性を示すことが証明された。

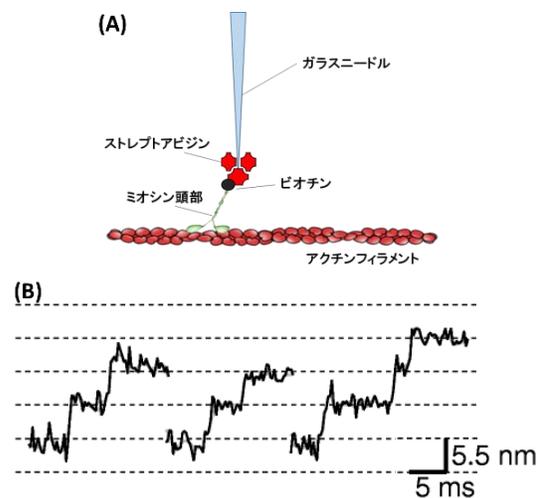


図 2 (A)ビオチンとストレプトアビジンの相互作用を利用し、アクチン上を運動するミオシン頭部の変位を計測する。(B)ニードルで計測したステップ長、平均 5.3 nm の連続サブステップを観測 Reprinted with permission from Nature, 1999 [2].

■ キネシンの構造と機能

キネシンは大腸菌を用いて組換えタンパク質の発現精製を行うことが可能であり、*in vitro* 運動アッセイに必要な精製したタンパク質や遺伝子組換え変異体の調製が容易である。さらにキネシンは連続的運動能という特徴を持ち、一度微小管と相互作用したキネシンは 100 ステップ程度連続的に移動するため、1 分子計測法の対象として適している。

キネシンの構造は重鎖二つと軽鎖二つからなる四

量体である。重鎖は ATP 加水分解部位と微小管結合部位を含むモータードメイン(頭部), コイルドコイル領域からなるストーク部位および荷物に結合する尾部より形成される。また, キネシンのレールとなる微小管は α -チューブリンと β -チューブリンからなるチューブリンダイマーが中空のチューブ状に重合したものである。微小管には極性があり, 重合速度に応じてプラス端, マイナス端が定められている。

キネシンは荷物を尾部に結合し, モータードメインが ATP を加水分解しながら微小管への結合解離を繰り返してプラス端方向へと移動することにより, 輸送小胞やオルガネラの運搬を担っている。

■ キネシンの運動のメカニズム

キネシンは連続的運動性という特徴を有しており, これは *in vitro* 運動アッセイによって証明された。 *in vitro* 運動アッセイは, ガラス表面にキネシンを固定し, その上を微小管が運動する様子を観察する手法(図3(A))とガラス表面に微小管を固定し, キネシンを吸着させたビーズまたは蛍光標識したキネシンがその上を運動する様子を観察する手法(図3(B))に大きく分けられる。さらに後者のアッセイ法と光ピンセットを組み合わせることによりキネシンが微小管上を 8 nm のステップ長で運動することが明らかとなった。

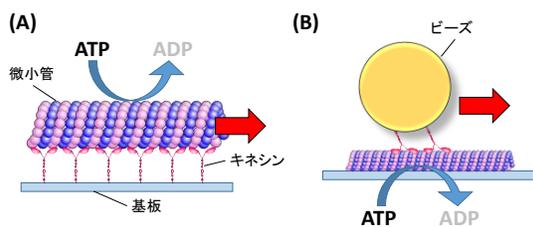


図 3 *in vitro* 運動アッセイの模式図

微小管上を運動するキネシンの運動メカニズムは hand-over-hand モデルが提唱されてきた。このモデルはキネシンが 2 つの頭部を交互に動かしながら人が歩くように移動するというものである(図 4)。溶液中のキネシン頭部には ADP が結合しているが, 微小管と結合することで一方の頭部から ADP が解離し

ATP が結合する。その後, もう一方の頭部からの ADP の解離が促進される。このように 2 つの頭部が等価的でなく, ADP の解離が交互に起こるため, キネシンの微小管上におけるステップ状運動が可能となっている。

キネシンの一方のモータードメインに蛍光色素を導入し, 一分子計測を行うことにより, モータードメインは平均 17 nm のステップで運動することが確認され, キネシンは hand-over-hand で運動していることが証明された。

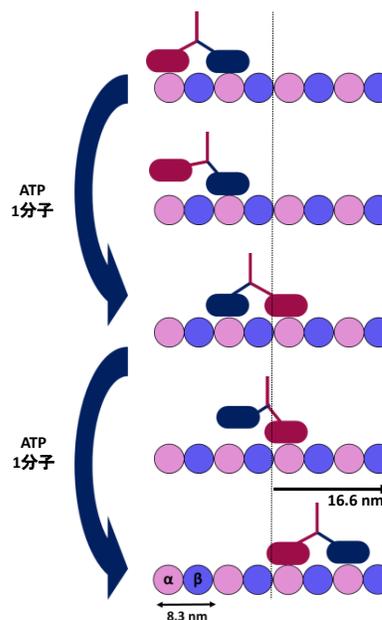


図 4 hand-over-hand モデルの模式図

参考文献

- [1]分子生物学 化学同人 2014
- [2]Kazuo Kitamura, Makio Tokunaga, Atsuko Hikikoshi Iwane & Toshio Yanagida, *Nature* **397**, 129-134 (1999).

佐々木廉, 角五 彰 (北海道大学)

51. FRET と分子ビーコン

光は様々な物質を透過するので、相互作用検出に光を検出するのは、非破壊的に状態を検出できるので、有用である。蛍光は蛍光色素が発する光であり、励起光が必要であるものの、可視光域に様々な種類の蛍光物質があり、目的に応じて使い分けが可能である。相互作用を検出には、相互作用すると光りだす反応が有用であるが、BIOMOD では FRET や分子ビーコンと呼ばれる方法が用いられる。

■ FRET と分子ビーコン

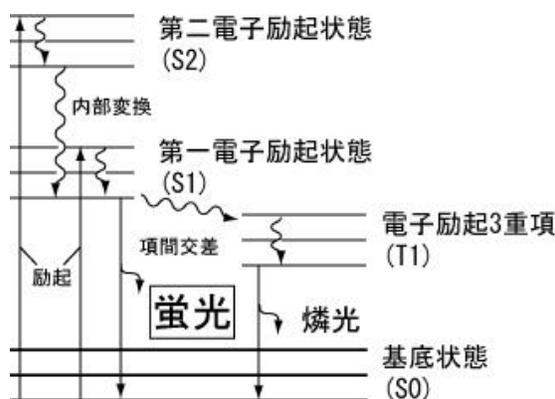
FRET は蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer, あるいは, Forster resonance energy transfer) の省略名である。2つの色素が非常に近い距離(-10nm)にある場合のみ、蛍光検出が検出されるので、2つの物体が近くにあるかどうか、相互作用しているかどうかを検出するのに用いられる。

分子ビーコンは、基本原理としては FRET と同様であるが、2つの色素ではなく、片方が quencher とよばれる、光を吸収するだけで、発光しない色素を用いているのが特徴である。同じ DNA や RNA 鎖の両端にそれぞれ、蛍光色素と quencher を結合させ、鎖内ハイブリできるように配列設計をしてあげると、普段は蛍光色素と quencher が非常に近くにあるので、蛍光が quench され、蛍光は観察されない。しかし、分子ビーコンが目標に結合すると、蛍光色素と quencher の距離が遠くなるので、蛍光色素の発光が観察されるようになる。

■ 蛍光について

蛍光は基底状態(S0)から励起状態(S1)に励起された分子が、エネルギー放出によって基底状態に戻る過程で放出される。この過程は、Jablonski ダイアグラムで現される。時間スケールとしては、励起状態への遷移が、フェムト(10^{-15})秒のオーダーで起こり、蛍光放出がナノ(10^{-9})秒のオーダーで起こるので、全体としては、ナノ秒程度の現象である。蛍光の発光エネルギーは、熱振動等により、蛍光色素が吸収したエネルギーよりも低くなり(波長が長波長にシフトする)、ストークシフト(Stokes's shift)と呼ばれる。

また、蛍光の性質(波長や寿命)は蛍光分子の運動や周囲との相互作用によって影響を受けるので、様々な蛍光分光法が開発されている。



■ FRET の原理

ある蛍光分子(ドナー)が蛍光がエネルギーを放出して基底状態に戻る際に、すぐ傍に、エネルギーを受け取る事が可能な蛍光分子(アクセプター)があると、遷移双極子間の双極子-双極子相互作用が起き、エネルギー移動が起きる。その結果、ドナーを励起しても、アクセプターにエネルギーが移動し、(ドナーの代わりに)、アクセプターが発光するという現象が起こる。エネルギー移動の起こる確率は、ドナーとアクセプターの相対的な配向(向き)に依存し、また、近ければ近いほど移動効率が高く、両者の距離の6乗に反比例する。普通使われる有機蛍光色素や GFP のような蛍光蛋白質では、-10nm の距離の範囲でエネルギー移動が起こる。

エネルギー移動の大きさを示す指標であるエネルギー移動効率 E_{FRET} は、2つの蛍光色素の距離を R とすると、

$$E_{FRET} = \frac{I_A}{I_A + I_D} = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad \text{式①}$$

I_D : ドナーの蛍光強度, I_A : アクセプターの蛍光強度と表される. ただし, ここで R_0 は E_{FRET} が 50% となる距離 (Förster 距離) であり, 以下の式で求められる.

$$R_0^6 = 8.785 \times 10^{-25} \kappa^2 \Phi_D n^{-4} J \quad \text{式②}$$

$$J = \int \varepsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int F_D(\lambda) d\lambda$$

式③

$\varepsilon_A(\lambda)$: 波長 λ におけるアクセプターのモル吸光係数

$F_D(\lambda)$: 波長 λ におけるドナーの蛍光強度

λ : 波長

κ^2 : 配向因子

Φ_D : ドナーの量子効率

n : 溶媒の屈折率

ここで, J は, ドナーの発光スペクトルと, アクセプターの吸収スペクトルの重なり的大小を表す量で, [$M^{-1} \text{ cm}^3$] の単位を持つ.

■ 分子ビーコンの原理

FRET において, アクセプターが受け取ったエネルギーを蛍光として放出するのではなく, 熱に変換してしまう物を **dark quencher** (クエンチャー) と呼ぶ. そのため, ドナーとアクセプターが近くにある状態では, 蛍光は検出されず, 遠くになるとドナー蛍光の発光が観察されるようになる.

通常は一本鎖核酸 (人工核酸) の両端に結合させ, ステムループ構造を持たせる. 標的に結合していない状態では, ドナーとクエンチャーが近い距離にあるので, ドナー蛍光は光らない. 一方で, 分子ビーコンが自ら持つプローブ配列 (標的配列に対して相補的な配列) を用いて標的に結合すると, ハイブリに伴ってドナーとクエンチャー間の距離が広がるので, ドナーの蛍光が観察されるようになる. この性質を利用して, 情報の状態を蛍

光で検出できるようになる.

参考文献

[1] 蛍光分光とイメージングの手法 (日本分光学会測定法シリーズ) 学会出版センター (2006/06); 御橋廣真 (編集) ; ISBN-13: 978-4762230462

多田隈尚史 (京都大学)

52. 人工細胞とリポソーム（とその周辺）

DNA ナノテクとの組み合わせで注目されているのが脂質二分子膜である。その閉じた小胞、マイクロカプセルはリポソームと呼ばれ、人工細胞の器ともよばれる超分子構造である[1]。分子デザインは単一分子から超分子、超分子複合体へとスケールアップが見込まれるが、その足掛かりになる脂質膜小胞の周辺を概観しよう。

■ はじめに

ヒトは錬金術の昔から生命をつくり出したい生き物で、「自己複製以外の方法」でそれが叶えば面白い生命の本質に迫れよう。プログラマブルなコンピュータ内での人工生命モデルとは異なり、実空間で人工生命を実現しようとする細胞の機能の一部再現を狙うのが現実的な路線で、細胞のモデルとなるマイクロカプセルにシンプルな分子群を導入したものが人工細胞と呼ばれる[1]。その担体としてよく用いられるのが脂質膜小胞、リポソームである。

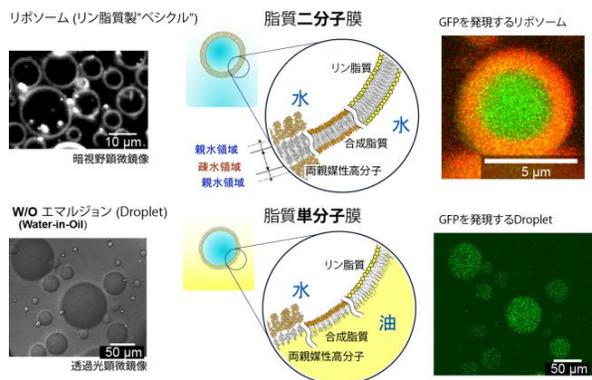
■ 脂質膜とは

脂質分子とは、両親媒性、つまり親水性と疎水性の性質をもつ官能基が結合した分子である。水中に分散すると、疎水性の分子を内側にした集合体となる。要は水と油の分離である。脂質分子の形状によって、球状（ミセル）、棒状（ミセル）、膜状（メンブレン）、板状（メンブレン）などさまざまな状態を示す。こうした共有結合より弱い力で集合した一対以上の分子の組織体を取り扱う学問を超分子（supramolecular）科学（化学）と呼ばれる。高分子化学と並んで、BIOMOD を戦う上で学んでおく便利なおすすめ分野である[3]。人工脂質膜としては、黒膜、LB 膜、Water-in-Oil(w/o) エマルジョン、そしてリポソームがよく知られている（図 1）。

■ リポソームとは

リポソームは脂質二分子膜の末端が閉じた小胞である。ベシクル（Vesicle）とも呼ばれる。1964 年に Bangham により報告された。その膜は微小体積を包む疎水性のバリアとして内外の分離能に優れ、細胞膜に類似した脂質二重膜構造をもつため、生体膜モデル、化粧品や DDS（薬剤送達システム[4]）、そして人工細胞に利用するための研究が盛んに行われて

いる。サイズや膜の状態によって SUV, LUV, MLV, GUV などに分類される。原料に、両親媒性の高分子（ポリマー）を用いたものにポリマーソームがあり、頑丈さや機能追加の容易さなどから注目されている。特に細胞サイズのリポソームは、1980 年代以降、宝谷らが暗視野顕微鏡による GUV の直接観察法に先鞭をつけ、蛍光ラベルした分子による高精度な観察手法も発達した[1]。内部に生化学反応系を仕込み、追跡し、評価する試みが多数行われてきている。最近では、マイクロ加工技術の進歩や先進的な工夫によって、サイズの揃った細胞サイズのリポソームも簡便に作製可能(≒ 89)になっている。



■ 人工細胞とは

物質から細胞を模倣し、あわよくば本物の細胞を組み上げようという願望は、生命の起源や宇宙生物学などの問題意識と結びつき、様々なモデルを構築してきた。トラウベやオパーリンのものが有名。生命の依り代である細胞が実は物質の集合体である一方でその間は物質への一方通行のみ、という対称性の悪さの謎を解き明かすために、人工細胞は使われる。物質とそのシステムがいかに振る舞うか、を細胞の観察のみならず細胞「類似の」場所をつくってつこうことで操作的に明らかにできる。タンパク質合成

系を純化したり[5], RNA の複製に突然変異を入れてダーウィン進化を再現したり[6], 合成脂質で膜の複製と DNA の複製をカップリングさせたり[7], 完全合成ゲノムが導入されたマイコプラズマ (愛称シンシア) が誕生したり[8], 細胞の全再構成を狙った研究では, 大腸菌の抽出液をリボソーム内に導入してタンパク合成を実現するなど[9], 日進月歩である. こうした研究は国内外で盛んで, 特に日本では 2005 年に「細胞を創る」研究会が発足している [10]. だが作ったコピーモデルは本物を越えられるのだろうか. 越えるとはどういうことだろうか?

■ というわけで「合成生物学」を 6 行で

分子システムから細胞を改造し, 機能を追加しよう, という新しい学問分野が合成生物学である. フルスクラッチビルドを狙う人工細胞・分子ロボティクスと被る部分も多いが, 主に応用面で期待されており, 最大の利点は自己複製機構を使える点にある. 国際学生大会に iGEM であり, BIOMOD の兄者.

■ 人工細胞と DNA ナノテクとの関連

通常の脂質膜は結合のゆるい超分子構造で, 個々の脂質分子は常に並進拡散している. その上に DNA オリガミを載せたなら, 海上のイカダ的に 2 次元の拡散運動を示す. BIOMOD の例を挙げると, 2012 年には, DNA オリガミで DNA 輸送用の貫通チャンネルをフルスクラッチして細胞膜に導入させるプロジェクト「CellGate」で東北大チームが優勝した. 大歓喜の帰国 1 週間後, Langecker らのオリガミチャンネルが *Science* 誌に発表された[10] (この大人版 CellGate に血相を変える筆者にメンバーは「危ないところでした」と言い放った). 翌年, ドレスデンチームは簡易版 CellGate を搭載したポリマーソームで 2 位を獲得, 2013, 2014 年の東大柏チームもオリガミ人工受容体構築から人工細胞ネタへと展開した. 本職科学者たちも論文を続々と発表しており, DNA 計算を実装した人工細胞系も報告されている. 人工膜・人工細胞系と DNA ナノテクの相性は良い. 活きた細胞との融合が次のターゲットだろうが, S. Douglas 監督が BIOMOD 初年度に発表した論文[11]

が高いハードルとなっている. 学部学生のチームが軽やかに越えてゆければ大変に痛快だろう.

■ おわりに

DNA も脂質膜もリボソームも細胞も生物も触れる, つまり工作可能な実体だが, 生命, となると言葉であり概念である. 人工細胞が生命を越えるにはどんなシステムが必要なのだろうか? これを考えるのはとても楽しいが, 人工物が生命のサブセットな間は人類の工作技術もまだまだなのかもしれない. ファインマンは「歯車の噛み合う様子を言葉で説明できるかい?」と問うた. せっかくの工学, 言葉で形容し難いものをつくりだしたいものである[12].

参考文献

- [1] 秋吉, 辻編「リボソーム応用の新展開」, NTS.
- [2] J.M. Lehn, 「超分子の化学」1997, 化学同人, 等
- [3] DDS については成書多数. W. M. Saltzman 等.
- [4] Shimizu, Y. *et al. Nat Biotechnol* **19**, 751–755 (2001).
- [5] Ichihashi, N. *et al. Nat Commun* **4**, 2494 (2013).
- [6] Kurihara, K. *et al. Nature Chem* **3**, 775–781 (2011).
- [7] Gibson, D. *et al. Science* **329**, 52 (2010).
- [8] Fujiwara, K. *et al., BIOPHYSICS* **10**, 43–48 (2014).
- [9] 「細胞を創る研究会」<http://www.jscsr.org> 岩崎秀雄「<生命>とは何だろうか」に詳しい. BIOMOD チームもポスター発表している. 同様に, 分子ロボティクス研究会 <http://molbot.org> 若手の会も活発に活動している.
- [10] Langecker, M. 他 *Science* **338**, 932–936 (2012).
- [11] Douglas, S. M. *et al., Science* **335**, 831–834 (2012).
- [12] ただ, 分子ロボの先に待つ分子仏教(萩谷昌己, 新学術領域分子ロボティクス領域会議@伊東, (2015))など, 冗談にしても言葉による工作は手強い.

野村 M. 慎一郎 (東北大学)



Molecular Governor 九州工業大学 2014 年

第 6 章

ソフトウェアテクニック

53. 概論：まず覚えたいソフトウェア

目に見えない生体分子の「デザイン」を競う BIOMOD だからこそ、自分たちの成果を分かりやすく表現する必要がある。審査は Wiki, YouTube, プレゼンに対して行われるため、成果を説明する効果的な文書、表、グラフ、プレゼンスライド、さらにはセンスの良いアニメーション、動画を作成してほしい。

■ まずはオフィススイートを覚えよう

とりあえず、Microsoft Office を使えば、審査に必要な全てのコンテンツ(☞ 3)を用意することができる。Microsoft Office とは、Microsoft 社が提供するオフィススイート(業務で必要なソフトウェアの集まり)であり、Word(文書作成)、Excel(表計算)、PowerPoint(プレゼン)は読者も使ったことがある、あるいは聞いたことがあるに違いない。他にもアップル社が提供する iWork もオフィススイートである。

■ なぜ色々なソフトウェアを覚えるべきなのか？

しかし、BIOMOD で Project Award Gold (金賞) を勝ち取ったチーム(☞ 5)は例外無く、Microsoft Office のようなオフィススイートだけでなく、実に様々なソフトウェアを駆使して、Wiki, YouTube, プレゼンを作り上げている。それはなぜか？「直感的に理解しやすい」、「説得力のある」、「見ていて楽しい」コンテンツを作成するには、画像、動画、2D・3D アニメーションを用意する必要があり、その表現

■ 効果的な画像を作りたいとき

PowerPoint でも図形ツールを使って作図を行えるし、写真の明るさ、コントラスト、色調の調整が可能であるが、Adobe 社が提供する Illustrator (グラフィックデザインソフト) や Photoshop (フォトエディタ) を使えば、表現力が格段に上がる(下図は Photoshop で作成されたイラスト)。これらは有償であるが、無償のソフトウェアで十分な機能を備える Inkscape, GIMP もオススメである。



(☞ 56)



3つのオブジェクトは、
文書(☞ 51,52)、実験データ解析(☞ 51, 55)、
画像(☞ 53,55,57)、数値シミュレーション(☞
57)、3D画像(☞ 54)、動画(☞ 56)で作られる。

↓
金賞を獲得するためには全ての要素においてワ
ンランク上のクオリティが必要である！

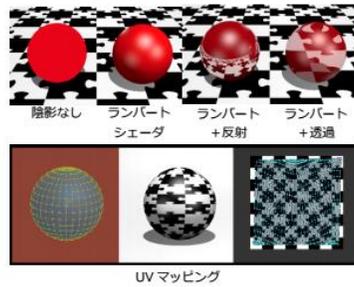
力は専用ソフトウェアを使うことでさらに高めるこ
とができるからである。

■ 直感的に理解しやすい3D画像を作りたいとき

Wiki, YouTube, プレゼンをより分かりやすくしたいときに、3D画像が効果的であることも少なくない。また、見ていて楽しい作品作りにおいても重要なスパイスである。様々な3DCG作成のソフトがあるが、いずれのソフトにおいても基礎となるモデリング、マテリアル、アニメーション、レタリングについて説明する。

■ 画像の説得力を高めたいとき

ウェット実験データの画像処理・解析ソフトの定番は Image-J である。このソフトはオープンソース、

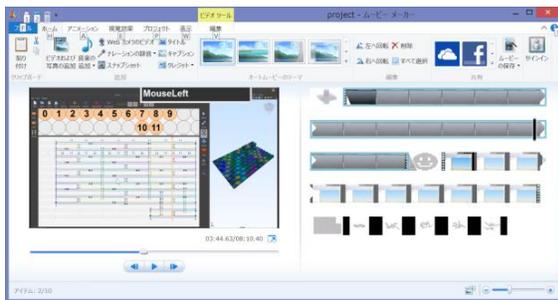


(☞ 57)

無償でありながら、プロの研究者でも満足するほどの高性能、高機能である。扱えるファイルフォーマットも TIFF, PNG, JPEG, BMP, AVI などの基本的なものから、特殊なフォーマットのものまで幅広い。BIOMOD に限らず、卒論、修論、研究において強力なツールとなるため、是非使い方をマスターしたい(☞ 58)。

■ 見ていて楽しい動画を作りたい

これまでの BIOMOD の採点基準では、YouTube のウェイトは 25%である(☞ 3)。従って、動画作成のスキルの向上は金賞を狙う諸君にとっては必須条件となる。商用ソフトの Premiere Pro, フリーソフトの Windows ムービーメーカー, AviUtl などを紹介する。



(☞ 59)

54. 文書・表・グラフ作成

オフィススイートとは、レポートや論文を作成するときに用いられる基本的なソフトウェアの集まりである。その中でも Word (文書作成)、Excel (表計算) は、会社での業務でも使われるため、是非使い方をマスターしたい。また、グラフ作成に関して Gnuplot についても紹介する。

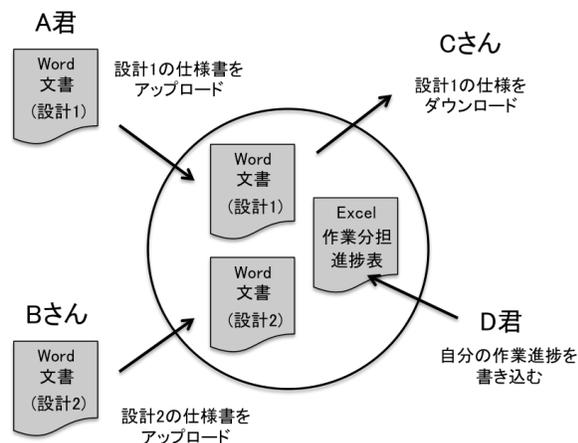
■ 文書作成

文書作成は、手書きでもできることであるが、あえてソフトウェアを使う意義は何であろうか? 様々な答えがあると思うが、BIOMOD でのチーム作業において、筆者は次の点を挙げたい。

- ・読みやすさ
- ・管理のしやすさ
- ・情報共有のしやすさ

プロジェクトのスタート時には、スケジュール、目標達成のためのロードマップ (行程表: 目標達成のために達成しなければならないことを時系列にまとめたチャート) をチームメンバーで話し合うであろうし、プロジェクト進行中は、定期的にミーティングを開き、設計仕様、分担された仕事の進捗状況などが活発に議論されるはずである (☞ 7)。チーム活動をより効率的に、かつ、効果的に進めるために Word などの文書作成ソフトを積極的に利用することをオススメする。文書作成ソフトは、現代の IT 時代においては、本来の読みやすさ、編集のしやすさという機能以上に、情報の管理と共有のための手段

チームでの情報共有に役立つ



となっている。企業では、会議資料は Word で作られ、電子的に配布され、会議後は議事録がさらに Word で作られて配布され…というスタイルは珍しくない。読者のみなさんもチーム作業を効率的に行うツールとして是非文書作成ソフトを活用されたい (ただし、ドキュメントを凝りすぎると手段のはずが目的となってしまうのでご注意ください)。

■ 表計算

表計算ソフトの代表例は Microsoft Excel であり、Word と同様に授業のレポート作成の際に利用したことのある読者も多いと思われる。BIOMOD では実験データの整理や解析において威力を発揮し、結果から表や多種多様なグラフを作成することもできるため、実験に書かせないソフトウェアと言える。すなわち、表計算ソフトには次の 3 つの役割がある。

- ・データの整理
- ・データの解析
- ・表、グラフ作成

データの整理に関しては、メニューの「データ」に、並び替え、フィルタ (データの抽出)、重複データの削除、集計、ピボットテーブルなどの基本的な機能が納められており、外部データソースとの連携 (インポート) も可能である。また、使い方を工夫することでチームでの共同作業の整理という点でも威力を発揮する。例えば、チームで作業を分担しているケースでは、各メンバーの作業担当一覧表を作成し、ネットワーク上で Excel ファイルを共有し、各人が担当作業の進捗を表にアップデートすることで、全体の作業の進捗状況が一目瞭然となる。これは単なる一例であるが、Word と同様に IT 環境をうまく利用することで、単なる表計算ソフトもまたチーム作業の効率を劇的に向上させる強力なツールとなり得

る。

データの解析に関しては、多種多様な Excel 関数を使いこなすことで平均や分散といった基本的な統計量の計算から母平均の差の検定、ノンパラメトリック検定、相関、多変量解析などの本格的な統計解析が行える。Excel による統計解析、多変量解析の本は豊富に存在するが、例えば、参考文献[1]はオススの一冊である。

また、Excel 関数を組み合わせて高度な計算やタスクを効率的に（一連の作業を自動的に）行いたいときに威力を発揮するのが「マクロ」である（メニューの「ツール」-「マクロ」）。マクロは Excel 用のプログラミング言語 VBA（Visual Basic for Applications）で作成できるが、興味のある読者は例えば文献[2]の入門書などがオススメである。

最後に表、グラフの作成であるが、メニューの「挿入」-「テーブル」、「グラフ」を選択することで手軽に作成することができる。特に、グラフは下図に示すように縦棒、折れ線、円、横棒、面、散布図、その他（株価、等高線、ドーナツ、バブル、レーダー）



から用途に適したグラフを選択することができ、Excel のグラフ作成機能を用いる一つの利点である。

■ グラフ作成

グラフ作成が効率的に行えるソフトウェアとして Gnuplot（ニュープロット／グニュープロット）も是非覚えてほしい。高機能でありながら無償で配布されたオープンソースのソフトウェアであり、2D・3D グラフ作成用のプログラミング言語とも言える。ウィザードに従って選択していくことでグラフが完成するという手軽さでは Excel に軍配が上がるが、多機能性、大量のデータを高速に処理し作図する性能に関しては Gnuplot が勝る。

参考文献

- [1] 涌井 良幸, 涌井 貞美, Excel で学ぶ統計解析—統計学理論を Excel でシミュレーションすれば、視覚的に理解できる, ナツメ社, 2003.
- [2] 立山 秀利, Excel VBA のプログラミングのツボとコツがゼッタイにわかる本, 秀和システム, 2007.
- [3] 大竹 敢, 矢吹 道郎, 使いこなす gnuplot, テクノプレス, 2004.

コラム TeX とは

理系の大学生の卒論は TeX（テフと読む）で書かれることが少なくない。また、分野にも依るが、学术论文も TeX を使って執筆されることも少なくない（もちろん、Microsoft Word も広く使われている）。TeX とは、フリーの組版システムであり、ユーザーはコンテンツである文章や図表を作成し、文書のレイアウトなどのコンテンツ以外の要素は、クラスファイル（あるいはスタイルファイル）や設定に基づいてコンピュータが行う。TeX での執筆は、HTML 言語でホームページを作るイメージに近く、Word での執筆に比べて面倒である。しかし、世界中でいまだに TeX が使われ続けている最大の理由は、TeX が作り出す数式が極めて美しいからであろう。

中 荃 隆（九州工業大学）

55. プレゼンスライド作成

BIOMOD のプレゼンテーションでは、PowerPoint を使用するのが一般的である。ここでは PowerPoint を使用したスライドづくりのポイント、コツ、やってはいけないことなどを紹介する。

■ プレゼンテーション

英語プレゼンの項(☞ 10)で述べたとおり、BIOMOD のプレゼンは学会発表とは異なり、物語性やエンターテインメント性を盛り込むことができる。しかし、何と言ってもプロジェクトの内容を伝えることが一番大切なことは言うまでもない。それをいかにわかりやすく伝えるかということに重点を置くべきである。

プレゼンの流れ (例)

1. タイトル, チーム名, 大学名
2. 背景, 動機
3. プロジェクトの目的
4. 動作原理とそれに基づく設計内容
5. 実験・シミュレーションの結果
6. 結論
7. 将来への展望, 夢
質疑応答

■ プレゼンテーションの構造

やったことの実をただ示すのがプレゼンではない。自分たちの主張したいポイントがどこであるか、何を強調したいかに応じて、重みや緩急をつけ、そのことが効果的に聴衆に伝わるようにすべきである。

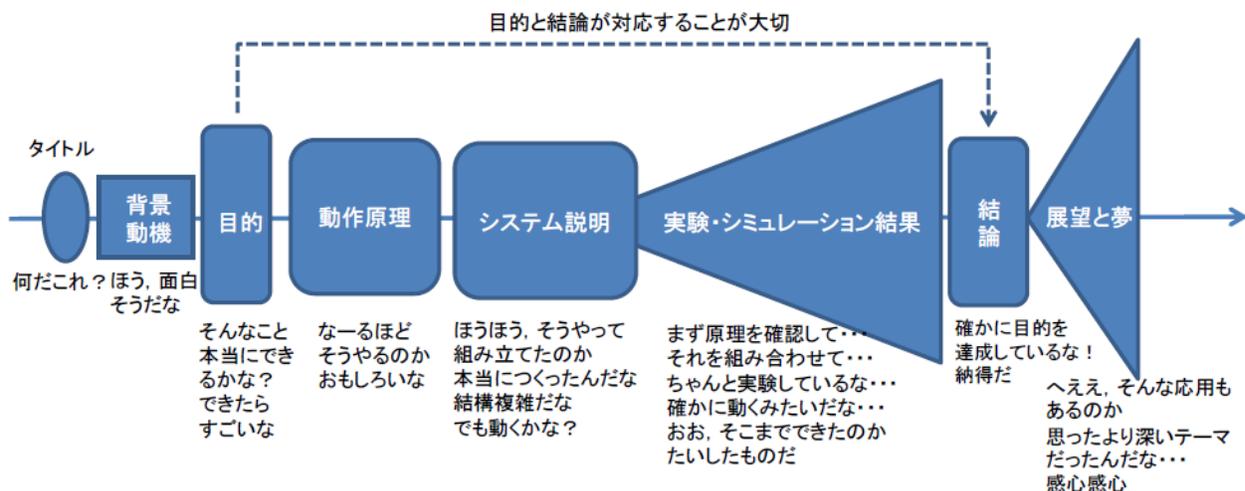
そのためには相手の心理まで考えたプレゼンの組み立てが必要である。もし実験がうまくいったなら、そこに山場を持ってくるべきである。実験はうまくいかなかったが、面白い原理を思いついたなら、その説明に重点を置く。どのような順番で結果を示したら一番納得してもらえるかよく考えよう。

どんな発表でも、目的と結論がきちっと対応していることが大切だ。これがちぐはぐだと、聞いている人は納得できない。さらに、得られた結果から広がる未来や夢を語ることができれば、きっと好印象が得られると思う。若者らしい夢をぜひのびのびと語ってほしい。

■ スライド作成上の注意

一般的なプレゼンのテクニックや PowerPoint の解説本がたくさん出ているので、担当する人は何冊か目を通しておこう。ここでは基本的なことだけを取り上げる。

- ・スライド作成の責任者を決めて統一感を出す
スライドづくりは、国内大会、本大会の Wiki 締切後の 1 週間にチームみんなで分担して行うことになるだろう。責任者を決めて、スライド全体に統一感を出すことが重要である。フォント、フォントサイ



プレゼンテーションの構造 (例)

よいスライド

- ・タイトルだけでもおおよそ言いたいことがわかる
- ・文字や図が見やすくはっきり書かれている
- ・必要十分な情報が書かれている。
- ・重要性に応じた枚数・面積が使われている
- ・話者の英語が聞き取れなくても大体わかる
- ・セリフと完全に連動している
- ・ほかのスライドと統一がとれている

わるいスライド

- ・何が主張したいポイントなのかわからない
- ・字や図が小さくて読みにくい
- ・重要なことなのに小さくしか書かれていない
- ・さほど重要でないことに派手な図が使われている
- ・セリフと異なる言葉が使われていて対応がわかりにくい
- ・スライドごとにテキストがまちまち

ズ、色使い、アイコンなど、注意する項目がたくさんある。

- ・時間配分
セリフ原稿を読んでストップウォッチで計測する。大切なことに時間をかけられるように、スライドの枚数配分を決め、セリフを調整する。
- ・セリフとスライドのシンクロ
セリフの用語とスライド上の用語は完璧に一致させる。セリフをいう順序と、スライド上の位置関係（上から下、左から右）も一致させる。
- ・スライドは見やすく・わかりやすく
一枚のスライドに情報を盛り込みすぎたはいけない。大きめの字で簡潔な文章を書く。一般に、一枚のスライドに7行までと言われている。
- ・名前やアイコンの同一性に注意する
同じものは同じ名前、同じアイコン、同じ色と形で表す。 大勢で分業すると、同じものを違う呼び名で読んだり、違うアイコンで示したりしがちである。これをやると聴衆の理解度はいっぺんに低下してしまう。チームワークの見せ所である。
- ・グラフにも一言説明を添える

スライドを見れば大体言いたいことがわかるようになってるのがよい。実験結果のグラフを見せるだけでなく、そこで言いたいことを一言添える。

- ・最後のスライド

Thank you for your attention. とかにしない。質疑応答の時間もこのスライドが表示され続けるので、成果の要約など **Positive** なメッセージを書いておこう。

- ・動画や特殊効果

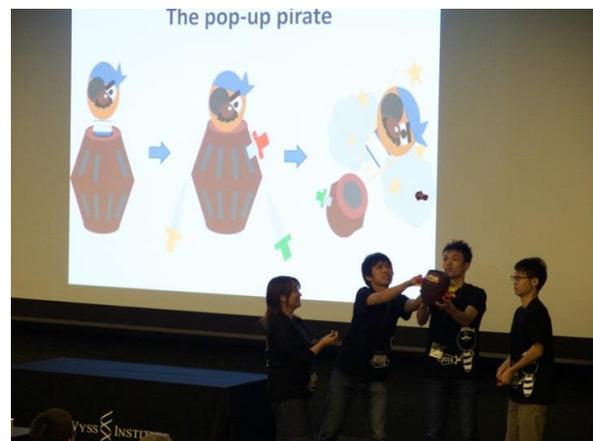
本番でスライドに埋め込んだ動画が表示されないという事故がままた起こるので、できるだけアニメーションを利用する。スライドの切り換えの効果は、ここぞというところだけで使い、濫用しない。

- ・プレゼンターとスライドめくり係は分業する
プレゼンターがセリフの暗唱に集中するため、めくり係を設けるとよい。めくり係りはセリフのどの箇所をめくるかを練習しておく。何回も練習して、時間通りできるようにしておこう。

参考文献

必ず通る！「資料」作成技術，日経 BP ムック，2014年（890円）

※実例が豊富でコンパクトに要点がまとめられているおすすめの本です。



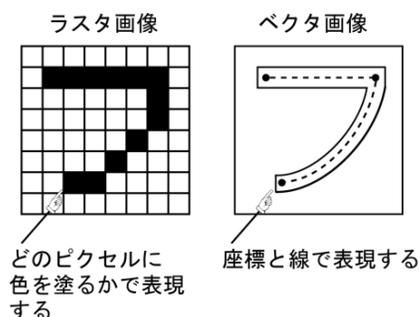
村田 智（東北大学）

56. 画像作成

視覚的な表現は、直感的な理解を助ける重要な手法の一つとなる。効果的な画像を作成することで Wiki, YouTube, プレゼンの印象は大きく変わる。ワンランク上の画像を作成したい読者は是非、グラフィックソフトの代表格 Illustrator とフォトエディタ Photoshop を覚えてほしい。

■ 画像作成には2種類の方法ある！

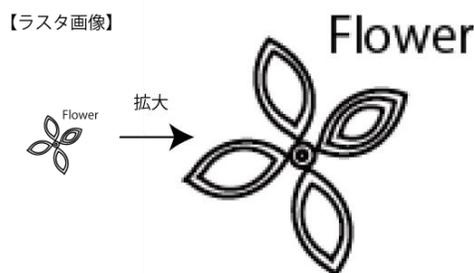
読者の多くが何らかのグラフィックソフト、ペイントツールを使って画像を作成したことがあると思う。Windows の「ペイント」は誰もが知るペイントツールであろう。実は画像作成ソフトには2種類あることをご存じでしょうか？あるいは、ラスタ画像、ベクタ画像という言葉を知っているだろうか？ワンランク上の画像作成を目指す諸君はこれらの特徴を理解した上で、用途に合ったソフトウェアを使っていくべきである。次図の左側の文字を構成する情報は、「ピクセル」であり、ラスタ画像と呼ばれる。一方、右側の文字を構成する情報は「座標と線」であり、ベクタ画像と呼ばれる。



■ ピクセルで絵を描くラスタ画像

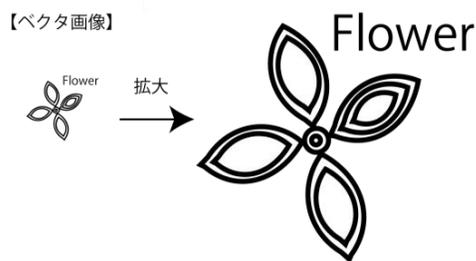
ラスタ画像はビットマップ画像とも呼ばれる。画像情報は各ピクセルの色（濃淡）情報となる。画像サイズが 640×480 ピクセルのラスタ画像が作られたとき、307,200 ピクセルの色（濃淡）情報をそのままファイルに書き出したものが BMP と拡張子がついた画像ファイルである。あるいは、情報に何らかの圧縮処理を行ってファイルサイズを小さくしたものが、JPG, PNG などの拡張子がついた画像ファイルである。Windows の「ペイント」は代表的なラスタ画像作成ソフトである。また、デジタルカメラで撮影された画像も当然ラスタ画像となる（カメラに

興味のある読者は理由を考えてみよう）。ラスタ画像は、ファイルサイズが大きくなる傾向があり、画像を拡大すると輪郭がぼやけるといふ欠点もある。



■ 線と面で絵を描くベクタ画像

一方、ベクタ画像の情報の基本は書き方（描画命令）となる。左図の右側を見てほしい。起点の座標と終点の座標、その間をどのように結ぶかといった情報（命令）で確かに図が描けることが理解できると思う。あるベクタ画像に対して、描画命令をファイルに書き出したものが AI, PDF, SVG などの拡張子がついた画像ファイルである。ベクタ画像は、ラスタ画像に比べてファイルサイズが小さく、画像を拡大しても奇麗に拡大される。例えば、ベクタ画像において、横方向に 10 倍の拡大は「座標(0,0)と座標(10,0)に線を描け」という命令が「座標(0,0)と座標(100,0)に線を描け」という命令になるだけなので、線はぼやけたりしない。



さて、「描画命令で絵を描く」といってもプログラムのように入力して画像を作成するのは

現実的ではない。ユーザーの作図作業は直感的に行えて、描画命令への変換はソフトがしてくれる…というソフトが欲しいところである。

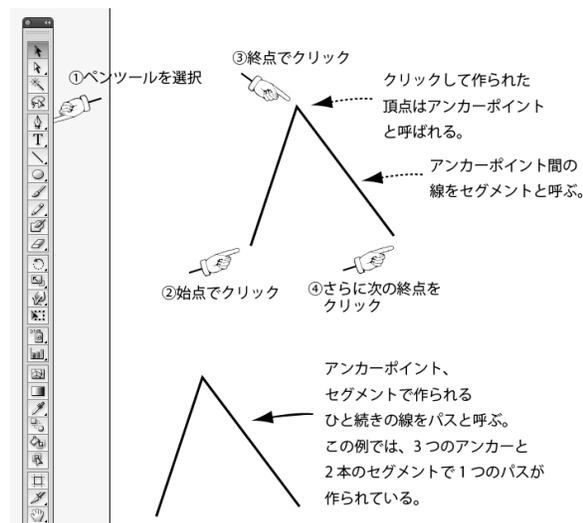
■ ベクタ画像作成ソフトの代表格 Illustrator

ラスタ画像作成ソフト以上に、ベクタ画像作成ソフトはその「使いやすさ」がとても重要となる。グラフィックソフト Illustrator (Adobe 社) は、代表的なベクタ画像作成ソフトである[1]。

Illustrator を使いこなす上で最初にマスターすべき点は、アンカーポイント、セグメント、パスである。実際に使いながら覚えることを是非オススメするが、次図において、①ペンツールを選択し、②描き始めのポイントでクリックするとその場所にアンカーポイントが作られる。次に③終点でクリックするとその場所にアンカーポイントが作られ、ペンツールはその 2 点間にセグメント (この場合は直線) を描く。さらに、描画を続けたい場合は、④次のアンカーポイントを作りたい点でクリックすることで、セグメントが追加される。アンカーポイントとセグメントで作られるひと続きの線をパスと呼ぶので覚えておいてほしい。初めて Illustrator を使う読者は、ペンツールの使い方をマスターすることから始め、

- ・ セグメント間に新たなアンカーを追加する方法
- ・ アンカー間を滑らかな曲線で結ぶ方法
- ・ 複雑な曲線の作成方法

を習得すると良い。



■ Inkscape は無料のベクタ作成ソフト

Illustrator はプロのデザイナーの厳しい要求にも答えられる高性能なソフトウェアである。従って、機能が豊富であるが、ソフトウェアを購入する必要がある。そこで紹介したいソフトが Inkscape である[2]。その基本的な機能は Illustrator 並みであり、何と云っても無償で利用できるため BIOMOD でワンランク上のグラフィックを作成したい読者には強力なツールとなるであろう。

■ ラスタ画像作成の代表格 Photoshop

では、ラスタ画像用のソフトウェアは不要であろうか？画像の中でもカメラで撮影される写真はラスタ画像であり、写真に対して効果を追加したり、コントラスト、明るさ、色調を調整するソフトウェアも必要である。このようなラスタ画像の中でも写真のような複雑な画像を処理するソフトウェアをフォトエディタと呼ぶ。その代表格が Photoshop (Adobe 社) である[3]。また、手書きで書いたイラストをスキャナで取り込み、Photoshop で加工することで次図のようなイラストを作成することもできる。



あるいは、無償でありながら Photoshop 並みの基本機能を持った GIMP もオススメである。

参考文献

[1]Illustrator の公式 HP (Adobe 社) :

<http://www.adobe.com/jp/products/illustrator.html>

[2] Inkscape の公式 HP : <https://inkscape.org/ja/>

[3] Photoshop の公式 HP (Adobe 社) :

<http://www.adobe.com/jp/products/photoshop.html>

[4] GIMP の HP : <http://www.gimp.org>

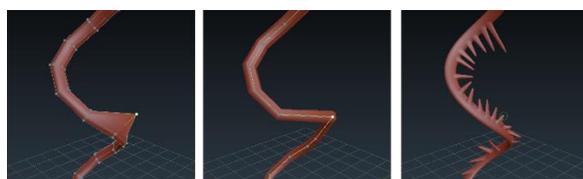
中 荃 隆 (九州工業大学)

57. 3DCG アニメーションの制作

分子の反応や機構を人に理解してもらうためには、アニメーションを用いることが非常に有効である。アニメーションの作成には何千枚という画像が必要なため、膨大な労力が掛かるが、三次元コンピュータグラフィクス (3DCG) を用いることで比較的簡単にアニメーションを作成することができる。

■ モデリング

最初にアニメーションをさせるためのモデル制作 (モデリング) について説明する。3DCG において、キャラクターなどのオブジェクトは、頂点、辺、面によって形成されている。これら三つをまとめてポリゴンという。モデリングには、ポリゴンを直接編集する ポリゴンモデリング、ベシエ、NURBS 曲線を使用してポリゴンを間接的に編集する 曲面モデリング、粘土をこねるように物体を生成する スカルプトモデリング の三つの方法がある。基本はポリゴンモデリングだが、円柱などの対称性がある形状には曲面モデリング、凹凸が激しい複雑な形状にはスカルプトモデリングが適している。ポリゴン数が多い (ハイポリ) ほど、複雑な形状を表現することが可能になるが、PC への負荷が大きくなるというデメリットがある。



ポリゴン
モデリング

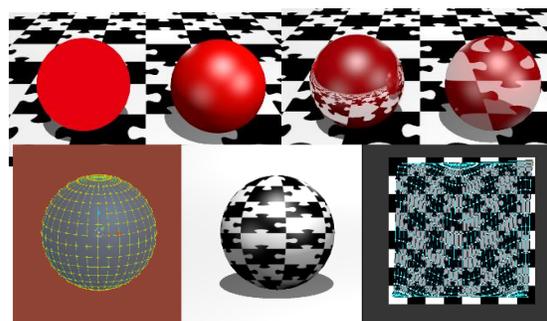
曲面
モデリング

スカルプト
モデリング

■ マテリアル

モデルの色、材質、光沢は マテリアル を設定することで変更することができる。模様やより細かい凹凸などディテールを表現するには テクスチャ を使用する。色などの模様が描かれているテクスチャをカラーテクスチャ、凸凹の情報が描かれているテクスチャを法線 (ノーマル) マップテクスチャという。これらのテクスチャは画像編集ソフトで作成することができるが、CG Textures などのサイトでダウンロ

ードすることもできる。テクスチャを使用するには、モデルのどの面にテクスチャのどこの部分を割り振るかを対応付ける作業 [UVマッピング] が必要になる。

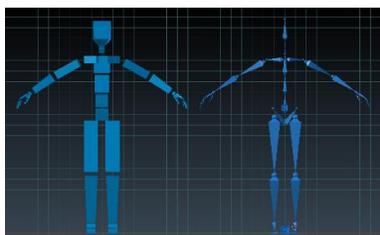


UV マッピング

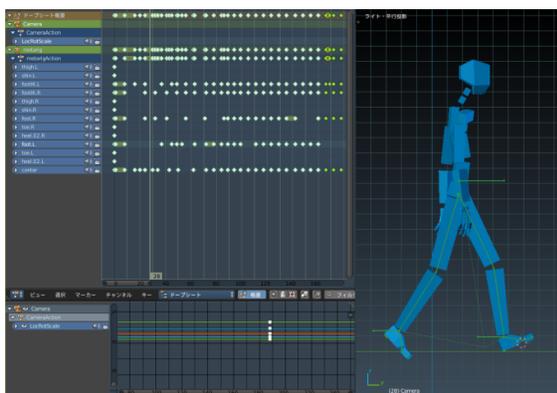
■ アニメーション

3DCG におけるアニメーションは、特定の時間ごとに登録されたモデルのポーズが、連続した動きとして補完されることで表現される。ポーズを登録することは、キーフレーム を打つといい、キーフレームを打つことでアニメーションを作成することを キーフレームアニメーション という。動きの補間についての細かい調整は グラフエディタ で行うことができる。人体や動物など関節を持つモデルを動かす場合は ボーン (スケルトン) を使用する。一つのボーンごとにモデルのポリゴンと関連付ける [スキニング] を行うことでボーンの動きに合わせてポリゴンが変形するようになる。ボーン (スケルトン) は階層構造を持っており、親の動きに子が追従する構造を FK (フォワードキネマティクス)、子の動きから親の位置を決める構造を IK (インバースキネマティクス) という。手や脚など、物体と接触する部位のボーンには IK を組むことが多い。モーションの自由度では FK に軍配が上がるが、歩く、物を押すなどの動作に

IK を使用することでアニメーションの生産性が飛躍的にあがるというメリットがある。アニメーションは手打ちで作成するのが基本だが、他にも、現実の人物や物体の動きから CG モデル用のモーションを生成するモーションキャプチャや、物理演算の結果をキーフレームに焼きこむなどの方法がある。これらの方法を使うことで、手打ちでは入力しきれないような複雑なアニメーションを制作することができる。



モデル (左)
スケルトン (右)



キーフレームアニメーション

■ レンダリング

レンダリングとは、光源を設置してモデルを照らすライティングとカメラの設定に従って画像を生成することを意味する。最終的な作品の品質はこのレンダリングの設定に大きく左右される。ライティングにはキーライト、フィルライト、バックライトを用いた三点照明が広く利用されている。レンダリングでは、カメラに入ってくるまでの光の経路を追跡することで反射、屈折を表現できるレイトレーシング、オブジェクトに当たって反射した光（間接光）を計算するグローバルイルミネーション、モデルの隙間や窪みに影を落とすことで立体感を強調するアンビエントオクルージョンなどの機能を使うことで、実

写に近い高品質な映像を得ることができる。

他にもモデルの輪郭線を強調する、陰影を二値化するなどの方法を行うことで 2D アニメのような画像をレンダリング[トゥーンレンダリング]をすることもできる。



三点照明

■ 最後に

ここで紹介したのは 3DCG 制作の一部に過ぎない。他にも物理演算やブーリアンなどの機能を利用することで物体の破壊や流体を表現することもできる。また、制作上のコツとして、リテイクに掛かるレンダリング時間を削減するために、背景、モデルの映像を別々に出力するのが一般的である。その際は PNG などの透過度を含んだ連番画像として出力し、後々、動画編集ソフトで合成する。実写背景と合成する場合にも応用できる。

3DCG制作に役立つサイト紹介

モデリングソフトウェア：メタセコイア

<http://metaseq.net/jp/>

人物モデル生成ソフトウェア：MAKEHUMAN

<http://www.makehuman.org/>

スカルプトモデリングソフトウェア：Sculptris

<http://oakcorp.net/zbrush/sculptris/index.php>

3DCGソフトウェア：Maya

<http://www.autodesk.com/education/free-software/maya>

3DCGソフトウェア：Blender

<http://blender.jp/>

Blender用フリーモデル配布サイト：BLEND SWAP

<http://www.blendswap.com/>

分子アニメーション制作ソフトウェア：MOLECULAR FLIPBOOK

<http://www.coolhunting.com/tech/molecular-flipbook>

テクスチャ配布サイト：CG textures

<http://www.cgtextures.com/>

津澤 卓, 川又生吹 (東北大学)

58. 画像処理

BIOMOD で使われる画像には、イメージ図とデータ取得用の図の 2 種がある。本項ではデータ取得用の図を対象に、実験の結果得られた画像からデータを取得するまでの処理について概観する。デジタル画像を、信頼できるソフトウェアで再現性の高い手続きによって処理し、よいデータを得ることが重要である。

■ 画像処理とは

画像処理とは、ある画像から知りたい・伝えたい情報を取り出すための技術である。世界初の画像は線画の牛に色がつけられたラスコー洞窟の壁画と言われており、当時の営みがよく伝えられている。現在の画像の主流は、完全複製が容易なデジタルデータであり、コンピュータ上で個々に輝度値をもつピクセル（ドット）の集合体として扱われる。そこからは、パターンと色を愛でるだけではなく、各種データ（長さ、輝度分布、粒子サイズ分布、閉曲線の複雑度など）を定量することができる。その技術を概観しよう。

■ 画像の種類

実験の結果として電気泳動、顕微鏡像（光学、蛍光、原子間力、電子）などのデジタル画像が得られることが多い。

BIOMOD で用いられる画像には、大きく分けてイメージ図とデータ収集用の 2 種類がある。データ収集用の画像は加工してイメージ図にできるが、イメージ図をデータにはできない。そして、データ収集用の画像について、よいデータはよい画像から得られる。

デジタル化された画像データにはさまざまな形式があり、拡張子によって分類される。JPG、PNG、TIFF、BMPなどがよく使われる。他にソフトウェアごとの独自フォーマットがあるが、データ処理用の画像は非圧縮の TIFF 形式が事実上、標準である。

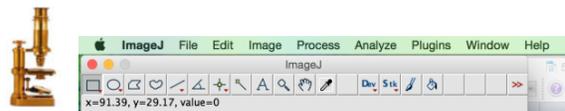
■ 前処理命

サスペンスものの TV や映画で、ぼやけていた容疑者の顔が画像処理によってくっきり鮮やかに...なんて場面があるが、画像処理は万能ではない。勿論、

各種マクロでデータ処理の自動化が可能である。しかしノイズだらけの画像からの抽出は非常に困難である。ノイズ除去のアルゴリズムにもいろいろある（ガウシアンフィルタ、メディアンフィルタ、2次元フーリエ変換して窓関数かけて逆フーリエ変換で戻す、など[*]）が、求めるデータを自動で得られるところに認識できるところまで処理するのは実際に観察した人間が行う前処理、になる。

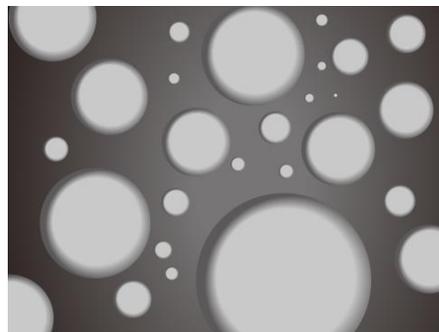
■ 画像処理の例

科学技術分野で主流となっている画像処理用フリーソフトウェアが **Image-J**[1]である。世界中の研究者が便利なマクロを無償で開発・公開している。



この ImageJ, UI こそ若干レトロだが最新の OS にも対応していて嬉しい。以下に、これを使った粒子解析の例を示す。

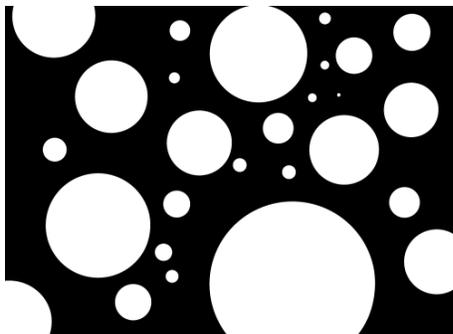
・元画像→TIFF 形式で保存→ImageJ に喰わせる
左上に 800 x 600 pixels; RGB; 1.8MB などファイル情報が書いてある。



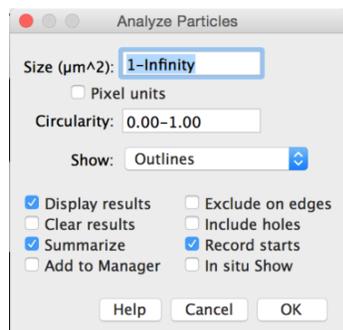
・スケール合わせ：20 μ m のスケールバーの上に手で Line を引き、Analyze→SetScale, を選ぶと Distance in pixels: 45 と表示→たとえば Known

distance: 20, Unit of Length : μm とする.

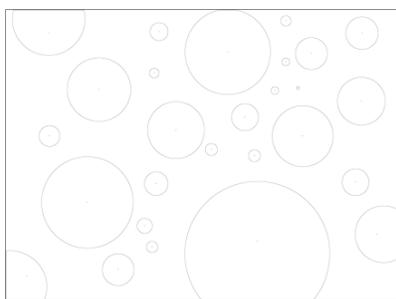
・2 値化する : Process→Binary→Make Binary,
白地に黒粒子になっていることを確認する. でなければ全選択して Edit→Invert で逆転させる.



・粒子解析 : Analyse→AnalyseParticles→カウント
条件を入力 (↓入力例) →OK



でカウントが開始される.



図の例では 27 粒子あり, 各粒子の面積が表示される.

Excel に書き出すことができる.

Results						
	Area	Mean	StdDev	Min	Max	XStart YStart
1	997.724	255	0	255	255	66 0
2	2092.183	255	0	255	255	1861 0
3	30.609	255	0	255	255	2433 51
4	303.067	255	0	255	255	3086 61
5	93.355	255	0	255	255	1332 110
6	294.382	255	0	255	255	2645 241

ImageJ 以外にも, 有名どころで Adobe Photoshop
やフリーソフトの GIMP[4]などが使えるが, 学術向

けならマクロが多い ImageJ で十分だろう. 詳細は
成書[5]を, CG やイメージ図の作成に関しては(☞ 56,
57, 59)を参照されたい.

■ 鉄則

目的に応じて要求は様々だが, 原則として

- ・ゴミがない (ゴミかどうかの判断は画像処理者には無理. 実験者にしか判断できない)
- ・コントラストがよい
- ・ノイズが少ない
- ・標的が光学的に大きく映し出されている
- ・解像度が高い
- ・濃淡のレベルが深い

などがある. まずはよい画像をとり, 楽に画像処理をするというサイクルに慣れよう.

参考文献

- [1] ImageJ のサイト : <http://imagej.nih.gov/ij/>
- [2] ImageJ 日本語情報 <http://seesaawiki.jp/w/imagej/>
- [3] 画像処理フィルタについて : 個人の Blog だが判りやすい <http://imaging-solution.net>*
- [4] GIMP は現在 Ver. 2.8. <http://www.gimp.org>, 初心者向け GIMP ガイドはこちら <http://synclogue-navi.com/category/gimp>
- [5] 小林徹也, 青木一洋 / 編「バイオ画像解析 手とり足とりガイド」, 実験医学別冊, (2014)

59. 動画編集

BIOMOD では Youtube Video に 25 点の配点があり、動画の作成が必須である。一概に正しい作成方法はないが、過去のチームの動画を例に、ソフトウェアを使った編集方法を紹介する。

■ 大まかな流れ

作成する動画についての方針が固まり、脚本や配役が決まれば(⇒ 9), いよいよ動画の作成である。**動画編集の大まかな流れとしては、素材データの収集、素材の編集およびエフェクトがけ、タイムラインの作成である。**ある程度動画が出来上がったら、他のメンバーに見せ、フィードバックを元に修正を繰り返す。いずれの作業においても適切なソフトウェアが異なる。基本的に、異なる作業には異なるソフトウェアを使う。

必要なデータとしては、映像、音声、BGM、字幕などがある。映像については、CG(⇒ 57)や実写の撮影により作成する。2011 年の東工大チームは PowerPoint のアニメーションと実写を組み合わせた映像で Youtube 賞 2 位になった。2012 年の東北大チームは実写と CG を組み合わせた映像で Youtube 賞 1 位になった。作成した映像に After Effects[1]などのソフトウェアで、細かいエフェクトをかける場合もあるが、詳細は省略する。

音声や BGM は、録音したりフリーの素材を使ったりする。音声の編集ソフトについては省略する。2014 年のアリゾナ州立大チームは自分たちで作った音楽を使い、Youtube 賞 2 位になっている。上記の例に限らず、どのような動画が評価されてきたかを参考にしてほしい(⇒ 5)。

■ 動画の編集

具体的な動画編集として、収集した素材をさらに加工し、切り貼りして、正しい位置や順番に並べる作業を行う。そのような作業を支援するソフトウェアは複数あり、人によって好みが分かれる。商用ソフトウェアであれば Premiere Pro[2], フリーであれば Windows ムービーメーカー[3]や AviUtl[4]などがある。それぞれの実行画面を図 1 にまとめる。

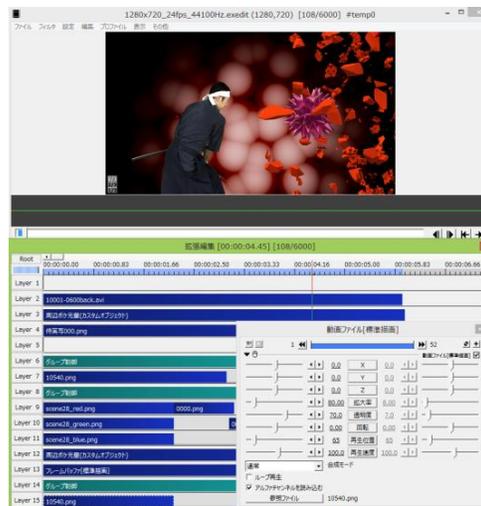
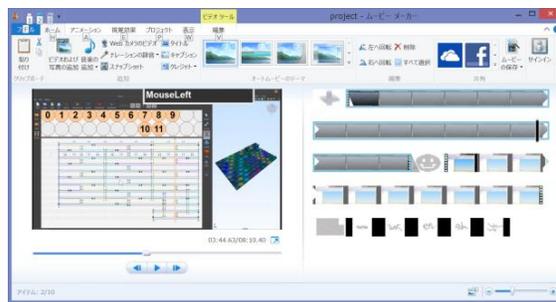


図 1 Premiere Pro, Windows ムービーメーカー, AviUtl の実行画面

いずれのソフトウェアでも、タイムラインの編集が中心的な作業になる。タイムラインとはどの時間にどの映像、音声、エフェクト、字幕が使われるかを指示したものである。AviUtlを使った2012年東北大チームの10秒程度のタイムラインを例として図2に示す。

右に行くほど時間が進んでいることを表し、縦方向にはその時間にどの素材が使われているかを表すレイヤーが並んでいる。青色は映像であり、文字による字幕も含まれる。赤色は音声またはBGMであり、緑色はシーン変更時のエフェクトである。

このように動画の演出などは複数の情報を指定して作成されており、編集者の腕が問われる部分でもある。プレビュー画面を見ながら少しずつ進めてほしい。

■ 動画の出力とアップロード

タイムラインが完成したら、エンコードを行い、動画として出力する。エンコードも奥が深く、すべて

の情報を網羅はできない。基本的にはYoutubeの設定[5]を参考にし、ソフトウェアからエンコードを行う。リンク先に書かれている通り、注意する点は、解像度、アスペクト比、フレームレート、ビットレート、コンテナ、コーデックである。完成した動画を再生し、映像が乱れないか、音が大きすぎたり小さすぎたりするシーンがないかチェックする。エンコードには時間がかかるので注意する。

動画が完成したら、いよいよYoutubeにアップロードする。アップロードした動画にはYoutubeのアノテーション機能により、リンクを埋め込むことができる。チームのwebページ(8)へのリンクをはると効果的である。

参考文献

- [1] <http://www.adobe.com/jp/products/aftereffects.html>
- [2] <http://www.adobe.com/jp/products/premiere.html>
- [3] <http://windows.microsoft.com/ja-jp/windows-live/movie-maker>
- [4] <http://spring-fragrance.mints.ne.jp/aviutl/>
- [5] 高度なエンコード設定
<https://support.google.com/youtube/answer/1722171>

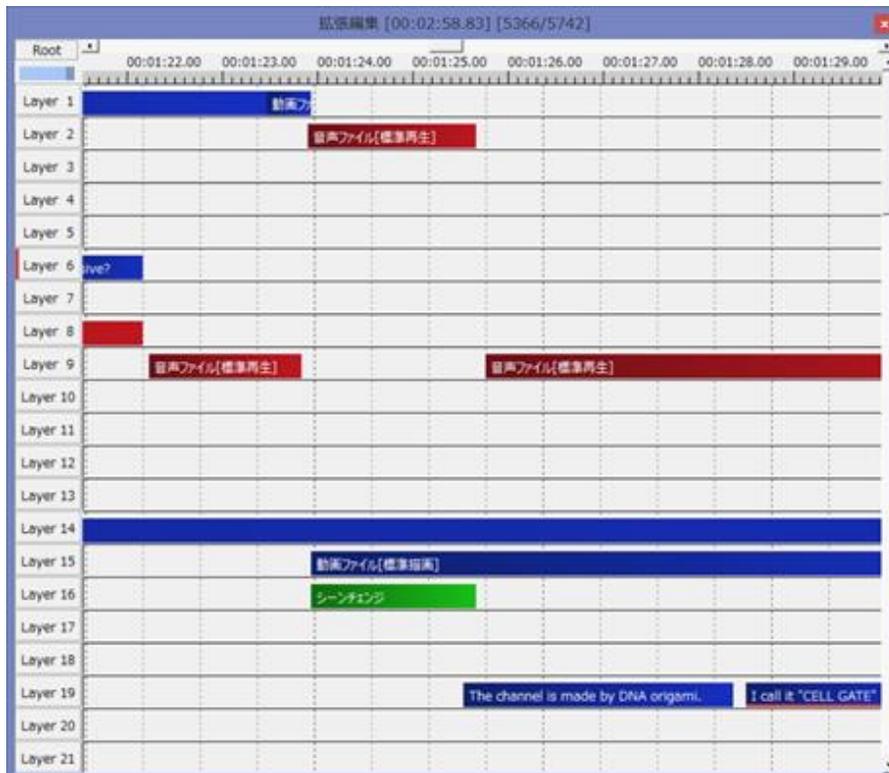


図2 Aviutlのタイムライン

60. 数値計算ライブラリ

Scilab (サイラボと読む) というソフトウェアをご存じであろうか? 無償で提供される数値計算, 可視化, 信号処理, データ解析のための高水準言語であり, 初心者にも理解しやすいプログラミング言語である. BIOMOD においても, 実験データの解析や数値シミュレーションで強力なツールとなる。

■ **C 言語を使いこなせば様々な解析ができるが...**
授業の宿題や卒論などで, 数値計算やデータ解析を行うとき, C 言語を使えば目的を達成するプログラムは書ける. C 言語の最大の魅力はその実行速度であり, メモリの管理やポインタを駆使することで大規模な数値計算も高速に処理することができる. C 言語は万能と言えるが, 目的の計算を行うための最適な選択肢とはならないこともある. 例えば, 次のような事例は典型的である。

事例 1 : 行列の固有値を計算したい

n 行 n 列の行列の固有値を計算するアルゴリズムを自分で線形代数の本を読み, コーディングする必要がある. 当然, デバッグにもそれなりの時間を費やすことになるであろう。

あるいは, C 言語用の行列計算ライブラリを探し, インストールし, 自分のソースコードからライブラリの関数を呼べるようにする必要がある. 当然, そのライブラリの信頼性も見極めねばならない (適当にネットで見つけたものを使うというのは色々な意味で危険...).

■ BIOMOD で典型的な事例

BIOMOD では DNA 反応の数値シミュレーションを行って, 設計理論や実験データの検証を行う場面も多い。

事例 2 : DNA 濃度の時間変化をシミュレーションしたい

この問題にはプログラマが解決すべき 2 つの課題が含まれる. 「常微分方程式の初期値問題の数値解法」と「結果の可視化」である. 数値解法に関しては, 数値積分ライブラリを探すことになり, 事例 1 と同様の状況になる. また, 可視化については, シミュレーション結果をファイルに書き出し, Excel

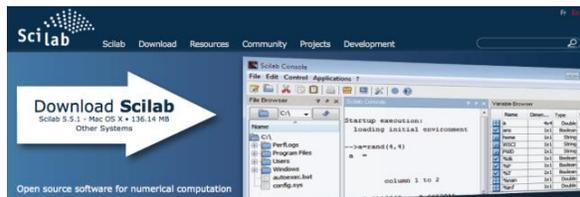
や Gnuplot (☞ 54) でファイルを読み込み, グラフを描画するのが手軽な方法であるが, もっと楽な方法はないのであろうか?

■ Scilab を使おう!

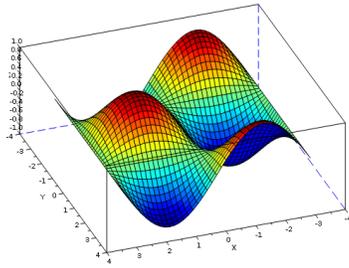
そこで紹介したいソフトウェアが **Scilab** である. Scilab は数値計算, 可視化, 信号処理, データ解析のためのプログラミング言語の一つであり, 次のような特徴を持つ。

- 1) 無償
- 2) 数値計算, 解析のライブラリが豊富
- 3) 2D, 3D グラフの作成も簡単

1) に関しては, BIOMOD においては特に重要であろう. Scilab のウェブサイト[1]から, ダウンロードし, パソコンにインストールすることで利用できる. Linux, Mac, Windows 版が提供されている. また, 日本語で書かれた書籍も充実している点が嬉しい。



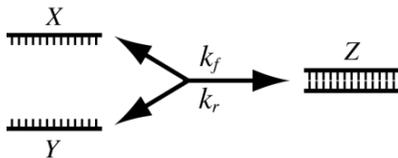
2) に関しては, プログラマは「数値計算ライブラリをどうするか?」という問題から解放され, Scilab をインストールするだけで線形代数, 数値積分, データ解析, 信号解析などの数値計算関数 (ソルバー) を使えるようになる. つまり, 読者は「関数の使い方」さえ分かれば良い. 例えば, 事例 1 では, 行列 A を定義したのちに, `spec(A)` とすることで行列 A の固有値が計算される. 事例 2 では, 数値積分関数 `ode` を使えばよい. 3) に関しては, Gnuplot (☞ 54) と同様に Scilab のグラフ描画関数も高機能であり, 美しい 2D, 3D グラフが作れる。



また、Scilab はプログラミング言語であるため、データのインポート、数値計算、グラフ作成といった一連のタスクをシームレスに行えることも魅力であり、C 言語に比べると文法は理解しやすく、データ型やメモリ割り当てをプログラマが意識する必要はない（筆者の研究室の学生も数日で基本的な使い方をマスターしていた）。

■ デモ：DNA ハイブリダイゼーションのシミュレーション

事例 2 のプログラミングの具体例を示そう。次図のような 1 本鎖 DNA (図中の X) とその相補的な DNA (図中の Y) のハイブリダイゼーション反応を考える。時間とともに、2 本鎖 DNA (図中の Z) の濃度が増加する様子をシミュレーションしたいとする。

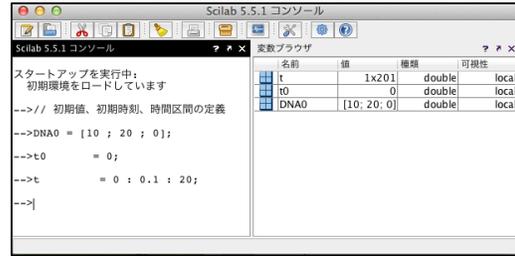


各 DNA の濃度の時間変化は反応速度論 (☞ 39) に基づいて、次式の微分方程式で表される。

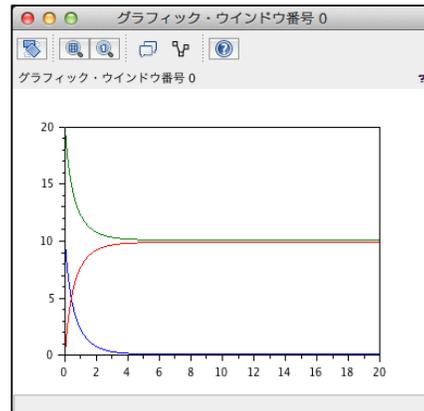
$$\begin{aligned}\frac{dX(t)}{dt} &= -k_f X(t)Y(t) - k_r Z(t) \\ \frac{dY(t)}{dt} &= -k_f X(t)Y(t) - k_r Z(t) \\ \frac{dZ(t)}{dt} &= k_f X(t)Y(t) + k_r Z(t)\end{aligned}$$

次図は Scilab を起動したときの画面である。画面左側コンソールに次のプログラムを 1 行ずつ入力する。ただし、各 DNA の初期濃度を $X(0) = 10\text{nM}$, $Y(0) = 20\text{nM}$, $Z(0) = 0\text{nM}$ とする。プログラム中の “//” はコメントである。また、基本的な文法の説明は省略

するが、ベクトルの定義と使い方が分かれば難しくない。



```
DNA0 = [10 ; 20 ; 0]; //初期濃度
t = 0 : 0.1 : 20; //開始時刻 : 刻み幅 : 終了時刻 [sec]
kf = 0.1; kr = 0.01; //結合定数, 解離定数
// 微分方程式の定義
function xdot = diffEqs(t, x);
    xdot(1) = -kf * x(1) * x(2) + kr * x(3);
    xdot(2) = -kf * x(1) * x(2) + kr * x(3);
    xdot(3) = kf * x(1) * x(2) - kr * x(3);
endfunction
// 微分方程式を解く
DNA = ode ("stiff", DNA0, 0, t, diffEqs);
// グラフ作成
plot ( t, DNA(1,:), t, DNA(2,:), t, DNA(3,:));
```



グラフの軸は適切にスケールされ、各 DNA の濃度変化のグラフは色分けされている。

参考文献

- [1] Scilab ウェブサイト : <http://www.scilab.org>
- [2] 大野修一, Scilab 入門-フリーソフトで始める数値シミュレーション, CQ 出版, 2009.

コラム 統計処理ソフト R

実験データに対して、何らかの統計処理を施すことは少なくない。基本的な統計量の計算であれば、Excel で十分であるが、本格的なデータ解析を行いたい読者にオススメするのは、統計処理ソフト R であり、R 言語とも呼ばれる。統計解析に関する豊富な計算ライブラリを有し、商用統計解析ソフトと比べても遜色ない。しかも、無償でダウンロードできるのも嬉しい。また、大規模なデータを解析する際には、PC クラスタシステム上で並列化もできるため、世界中の大学や研究所でも広く利用されている。

The R Project の公式 HP :

<http://www.r-project.org/index.html>

61. DNA 分子設計のためのソフトウェア

DNA 分子を使ってシステムを設計する場合、その物理・化学的な性質を理解し活用する必要がある。精密・あるいは大規模なシステムを設計するには、ソフトウェアによる設計支援が有効である。どの場面でどのソフトウェアが利用できるか、大まかな戦略を紹介する。

■ ソフトウェアによる設計支援

DNA 分子の幾何学的、熱力学的、反応速度論的な性質に基づいて、様々なシステムが開発されている。システムの大規模化に伴い、経験則に基づいた設計手法では、予期せぬ見落としをしてしまう危険性が大きくなっている。また時間の制約がある中では、そもそもの専門的な物性を理解し、精密なシステムを設計するのは困難である。

そのような問題を回避するには、ソフトウェアによる設計支援が有効である。DNA 分子システムの設計の際に、どの場面でどのソフトウェアが利用できるか、幾何学、動力学、熱力学、反応速度論などの異なる観点で分類し、大まかな戦略を紹介する。

■ 幾何学的性質

DNA 二重らせんの幾何学的な性質(☞ 17)を使い、2次元、3次元の構造が作成されている。設計の際には、らせんの位相やピッチ、原子間距離などを考慮

する必要がある。ソフトウェアとしては、DNA の全原子をモデル化できる Namot、二重らせん構造の 3次元モデル化に特化した Nanoengineer-1、クロスオーバーを元に DNA オリガミ構造を設計する caDNAnoがある(図 1)。システムの規模や特徴に応じて使い分ける必要があることに注意する(☞ 66)。

■ 動力学的性質

DNA の構造体が溶液中でどのような挙動を示すか予測することで、構造の安定性や、変形のしやすさを評価することができる。全原子モデルであれば NAMD などの既存の分子動力学ソフトウェアが有効である。caDNAno で作成した構造のファイルを利用すると、CanDo による安定性の解析や oxDNA による粗視化分子動力学シミュレーションを行うことができる(☞ 65)。いずれの場合でも、溶液中で DNA 構造がどのようにブラウン運動をしているか予測することが可能である(図 2)。

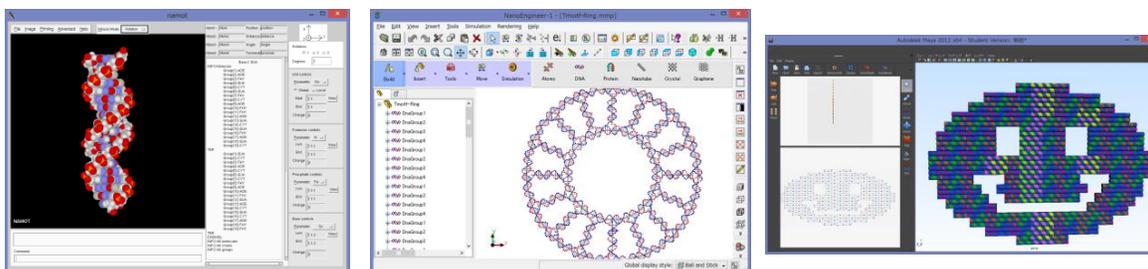


図 1 構造設計のソフトウェア(左から Namot, Nanoengineer-1, caDNAno)

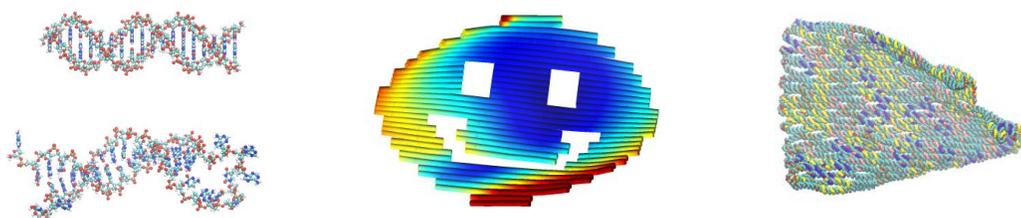


図 2 動力学シミュレーション(左から NAMD, CanDo, oxDNA の実行結果)

■ 熱力学的性質

DNA の 3 次元的・立体的な構造ではなく、どの配列がどの配列にハイブリダイゼーションするかという二次構造の予測を行うことは、DNA 分子システムを設計する上で重要である。さらに配列の情報から熱力学的な自由エネルギーや T_m を予測すること(☞ 41)も可能であり、期待通りの二次構造を作るか、予想しない二次構造を作らないかという指標になる。そのような指標は、目的の二次構になる配列を設計するという逆問題に应用することができる[1]。

ソフトウェアとしては NUPACK, DINAmelt を使う(☞ 62)。いずれも二次構造や自由エネルギーの予測が可能である。単純な配列設計や複数 DNA による二次構造予測に関しては NUPACK が得意であり、 T_m や熱容量の評価に関しては DINAmelt が得意である(図 3)。

また DNA コンピューティングやタイルアセンブリで使用する複数の DNA 配列の設計に関しては、期待しない組み合わせでハイブリダイゼーションしないことを担保するために、専用のソフトウェアを使うことが重要である。DNA Design などが挙げられる(☞ 63)。

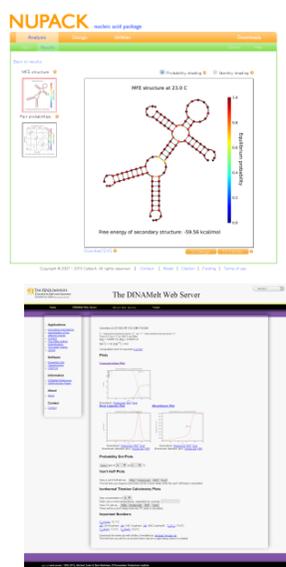


図 3 熱力学性質の予測(上から NUPACK, DINAmelt)

■ 反応速度論的性質

DNA コンピューティングの分野では、一つ一つの DNA 分子に着目するのではなく、溶液中の分子の濃度がどのように時間発展するかを予測することが重要である。具体的には化学反応式から常微分方程式を立て、数値計算を行う。方程式そのものはプログラミングをするか、単純化した記法により表現する。

鎖置換反応(☞ 42)を使ったシステムの設計に関しては、DSD と呼ばれるソフトウェア(☞ 67)が有効である(図 4)。酵素反応を使う Toolbox 反応系に関しては、DACCAD が有効である(☞ 33)。いずれの場合でも、扱える DNA の構造には制約があるため、一般のシミュレーションを行うためには Scilab などの汎用の数値解析ライブラリを使う必要がある[2,3]。

参考文献

- [1] M. Andronescu, AP. Fejes, F. Hutter, HH. Hoos and A. Condon: "A new algorithm for RNA secondary structure design", J Mol Biol. 336, 607--624, 2004.
- [2] Lulu Qian, Erik Winfree: "A simple DNA gate motif for synthesizing large-scale circuits", Journal of the Royal Society Interface, 8, 1281--1297, 2011
- [3] Kevin Montagne, Raphael Plasson, Yasuyuki Sakai, Teruo Fujii, Yannick Rondelez: "Programming an in vitro DNA oscillator using a molecular networking strategy", Molecular System Biology, 7, 466, 2011

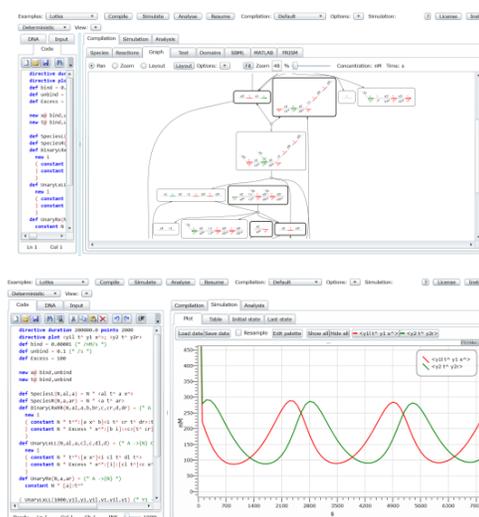


図 4 DSD による反応速度論シミュレーション

川又 生吹 (東北大学)

62. DNA 2 次構造予測

DNA の 2 次構造予測とは、DNA の塩基配列から安定な 2 次構造を予測すること、またはその技術である。本稿では、2 次構造予測の代表的なプログラムである、NUPACK と DINAMelt について紹介する。いずれも web 上で動作するので、是非、一度は触ってみてほしい。

■ NUPACK の機能と使い方

NUPACK は、Caltech の Robert Dirks 博士によって開発されたプログラムである。DNA (RNA) の塩基配列を入力すると、溶液中で取りうる 2 次構造、すなわち、自由エネルギー的に安定な 2 次構造を出力してくれる。以下は、NUPACK に入力できる情報と、ユーザに出力してくれる情報のリストである。

【入力情報】

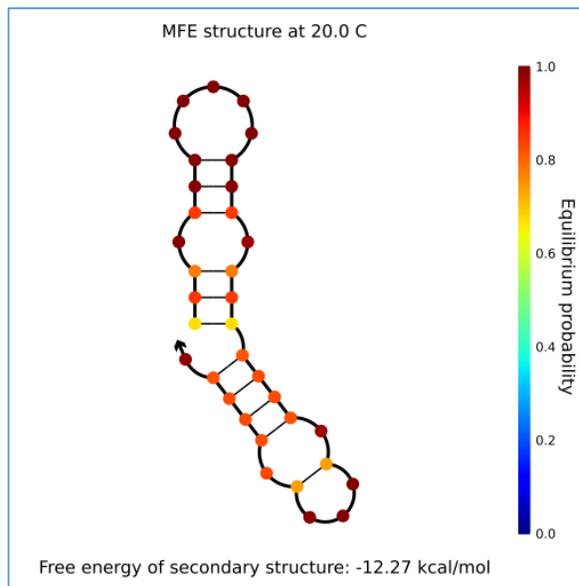
- RNA か DNA か？
- 反応温度
- DNA 鎖の数
- 2 次構造を形成する DNA 鎖数の制限
- 各 DNA の塩基配列と濃度
- Na^+ , Mg^{2+} の濃度

【出力情報】

- 安定な 2 次構造とその溶液中の濃度
- 融解プロファイル
- 各塩基が塩基対を形成する確率

特筆すべき事項としては、web 上で使用可能なアプリケーションということである。インターフェースが直感的で、かつデモプログラムもあるので、一度操作してみることをお勧めする (<http://www.nupack.org/>)。

以下の図は、例として適当な DNA の塩基配列、「GGTATGCGATGAGCACACCCGCGGGTTTCGCGCGT」を入力した場合の結果のスクリーンショットである。これを見ると、上記の塩基配列を持つ DNA は、溶液中でヘアピンループやインターナルループを複数形成する構造が最安定であり、そのときの最小自由エネルギー (☞ 42) は、 -12.27 kcal/mol ということが分かる。



NUPACK は、他にも望みの構造を形成するような塩基配列を設計する機能もあり、こちらも web 上から利用することが可能である (☞ 64)。

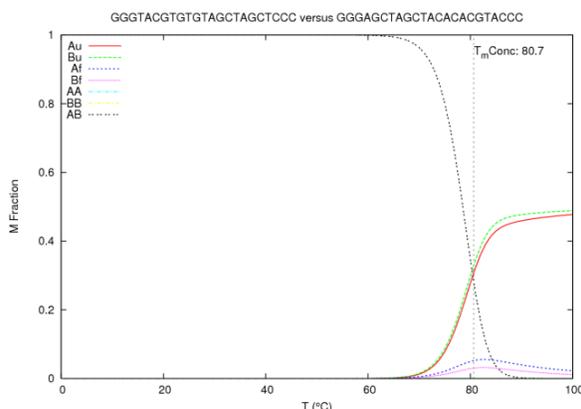
■ DINAMelt の機能と使い方

DINAMelt は、レンセラー工科大学の Nicholas R. Markham 博士によって開発された Web 上で使用可能なプログラムであり、NUPACK と類似の機能を持つ。DINAMelt の開発陣には、RNA 2 次構造予測の創始者である Michael Zuker 博士がいるので、こちらが 2 次構造予測プログラムの本家という見方もできるだろう。実際、NUPACK と DINAMelt は、基本的に同じ構造予測アルゴリズムを用いているが、そのアルゴリズムは、1981 年に Zuker 博士が開発したものの拡張版になっている。

更に、2 次構造予測に必要な自由エネルギーパラメータに関しても、両プログラムとも SantaLucia 博士が算出したものを使っているため、細かい相違

を除けば、2次構造予測の結果は同じになるはずである。

NUPACKと比較して、DINAMeltにしかできないこととしては、詳細な熱力学的解析が可能という点である。次の図は、2種のDNAを反応させた際、それぞれの反応種の、温度に対する濃度変化をプロットしたものである。



また、安定な2次構造とその際の自由エネルギーだけでなく、エンタルピー、エントロピー、融解温度、熱容量も算出してくれる。

一方、NUPACKにできるがDINAMeltにできないことは、「3本以上のDNAからなる2次構造の予測」、「DNAの塩基配列設計」である。従って、どちらのプログラムを使うかは、用途に応じて自ずと決まってくるであろう。

BLASTを使うと、例えば、サルが持っているある遺伝子に類似した遺伝子を、ヒトが持っているかどうかを簡単に調べることができる。

通常、遺伝子のデータベースは巨大なため、まともに類似配列を検索したのでは時間がかかり過ぎてしまう。そこで、BLASTでは、まず簡単で時間のかからない方法で類似度をチェックしてみて、そこで望みの薄い配列をあらかじめ候補から弾いてしまう。このような工夫を重ねることによって、計算時間の大幅な削減に成功している。生体分子の挙動や性質を予測するようなソフトウェアでは、予測の正確性もさることながら、予測に要する時間も非常に重要なファクターとなる。BLASTや本稿で紹介したNUPACK、DINAMeltは、その両者を満たしたソフトウェアであるため、多くのユーザに活用されている。

ところで、DNAの2次構造予測にかかる計算時間は、塩基配列の長さの3乗に比例することが知られている。そのため、例えば、塩基配列の長さが10倍になると、計算時間は1,000倍近くになる。NUPACKやDINAMeltを使用する際には、この点に注意されたい。

コラム BLAST

DNAはもともと生命の設計図である。そのため、DNAの遺伝子としての性質を調査したいという動機から、2つの塩基配列がどれくらい似通っているかを調べたい場合がある。

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) は、バイオインフォマティクスでよく使用されているプログラムの一つであり、DNAの塩基配列が与えられたとき、それと類似する塩基配列を巨大なデータベースから検索して表示してくれる。

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

参考文献

- [1] NUPACK. <http://www.nupack.org/>
- [2] DINAMelt <http://mfold.rna.albany.edu/>
- [3] Markham, N. R. & Zuker, M. (2005) DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.*, 33, W577-W581.
- [4] SantaLucia, Jr., J. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1460-1465.

田中文昭 (産業技術総合研究所)

63. 配列設計

DNA の配列が分かれば、アルゴリズムによってどのような二次構造をとるか予測が可能である。配列設計はその逆問題である。二次構造や配列に関する制約を与え、その条件を満たす配列を探してくる。単純な二次構造を作るだけであればランダムな配列でも問題ないが、条件が複数になると極めて難しい問題となる。配列設計の指針とソフトウェアの使い方を紹介する。

■ 二次構造予測と配列設計

DNA 配列のどの部分とどの部分がハイブリダイゼーションすると最も安定な構造になるかを予測するのが二次構造予測(☞ 43)である。効率良く予測するアルゴリズムが知られており、いくつかのソフトウェアが公開されている(☞ 62)。

DNA のタイル構造(☞ 20)や鎖置換反応(☞ 42)で駆動するシステムを設計する際には、その逆問題を解く必要がある。すなわち、目的の二次構造を与え、その構造になる塩基配列を求める問題である。

単純な解決策として、未決定の部分にランダムな配列を選ぶ手法がある。一度配列が決まると、その相補鎖は自動的に決定する。その配列で二次構造予測を行えば、目的の構造になるはずである。

一見簡単な問題だと思われるが、ランダムに配列を作ったのでは、結合してほしくない部分同士が結合してしまい、準安定な副産物ができてしまう可能性がある。そのような副産物ができてしまつては、構造形成や状態変化に支障がでる。

問題を回避する手法の一つとして、すでに直交性が担保されている配列の利用が提案されている[1]。23 塩基の DNA が 37 種類与えられており、互いに予期しない干渉をしないことが報告されている。

■ 配列設計ソフト

しかし塩基数の長さや種類は設計ごとに変わるため、その都度条件に応じた配列が必要になる。そこで有効なのが配列設計ソフトである。さまざまなグループで開発が進められているが、配列設計問題は対象とする問題ごとに細かい条件が異なるため、デファクトスタンダードとなっているソフトウェアはない。いくつかのソフトウェアを紹介する。

■ NUPACK の設計機能

二次構造予測のオンラインソフトウェアである NUPACK[2,3]には、配列設計の機能がある。

NUPACK のサイトにアクセスし、タブの Design を選択する。デモを使い、その使い方を説明する。

まずは上部パラメータを設定する。例えば核酸の種類は DNA、温度は 26°C、設計数は 2 とする。次に Target Structure の枠に、設計したい二次構造をドット・ブラケット・プラス記法で記述する。記法は図 1 のように、ドットが水素結合していない塩基を、対応する左括弧と右括弧は水素結合を行う塩基対を、プラスは DNA の切れ目を表す。

その後、右下の Design を押すと、しばらくの間配列の設計が行われ、図 2 のように設定した設計数だけ塩基配列のセットが出力される。図 2 は棒人間の二次構造になる配列を設計したものである。上に位置しているセットほど良い配列である。

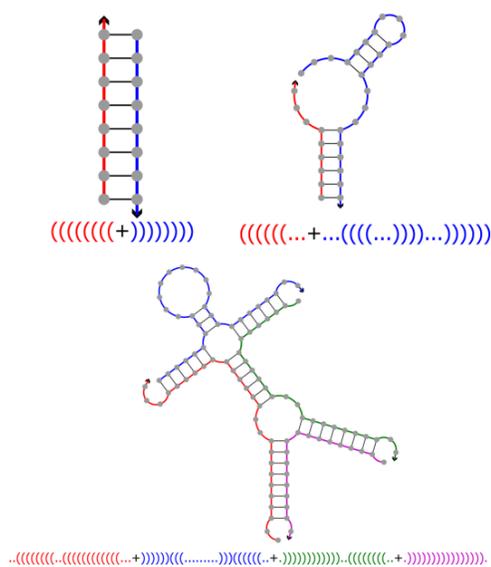


図 1 ドット・ブラケット・プラス記法



図 2 配列設計結果

設計された配列の横にある To Analysis を押すと、その配列を使った二次構造解析を行うことができる。期待通りの二次構造になるか確認することができる。もし予期せぬ構造ができている場合は、条件や構造を変えて、配列設計を再度行う。

Target structure の枠には様々な制約条件を記述することができる。詳細は NUPACK の Help に書いてあるので省略するが、例えば一部にすでに決定している配列を使ったり、特定の配列を避けるような設定もできたりする。

■ タイルの設計を行う DNA Design

DNA タイルの設計には DNA Design toolbox[4]が活用できる。 こちらは MATLAB で書かれたツールである。各配列の塩基をアルファベットの列で書き、相補鎖による結合関係を数字の列で表す。設計したい塩基は ATGC 以外のアルファベット、例えば N によって表す。プログラミングの知識が必要になるが、使い方に慣れれば、さまざまな組み合わせの配列を設計することが可能である。

■ 組み合わせ最適化を行うソフトウェア

予期しない構造を避けて設計を行うには、配列の相似性や二次構造の自由エネルギー(☞ 41)を考慮した配列設計プログラムが必要になる[5,6]。 様々なトレードオフがある条件から、最適な組み合わせを持つ配列を探すのである。

オンラインで公開されているソフトウェアは限られているが、**一つの例が CircDesigNA である[7]。** エネルギーの計算に基づいた配列設計を行っている。こちらのソフトウェアは図 3 上部のようなインター

フェースが付属しており、文字列によって作りたい二次構造を入力する。

また東北大学でも[5,6]を参考にした配列設計ソフト **Sequence Design** を開発している。こちらは DNA コンピューティングのための配列設計ソフトであり、BIOMOD2014 東北大チームで使用された。図 3 下部のようなインターフェースを持ち、アルファベットの列によって必要な DNA を記述する。利用したい場合は[8]に連絡をする。

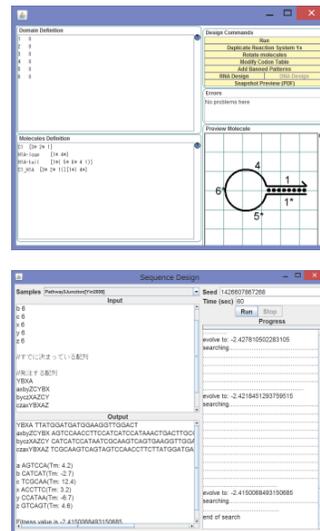


図 3 CircDesigNA と Sequence Design

参考文献

- [1] Tetsuro Kitajima, Masahiro Takinoue, Ko-ichiro Shohda, Akira Suyama: "Design of Code Words for DNA Computers and Nanostructures with Consideration of Hybridization Kinetics", LNCS, 4848, 119--129, 2008
- [2] <http://www.nupack.org/>
- [3] Joseph N. Zadeh, Conrad D. Steenberg, Justin S. Bois, Brian R. Wolfe, Marshall B. Pierce, Asif R. Khan, Robert M. Dirks, Niles A. Pierce: "NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems", Journal of Computational Chemistry, 32, 170--173, 2011
- [4] <http://centrosome.caltech.edu/DNAdesign/>
- [5] Fumiaki Tanaka, Atsushi Kameda, Masahito Yamamoto and Azuma Ohuchi: "Design of nucleic acid sequences for DNA computing based on a thermodynamic approach", Nucleic Acids Research, 33, 903--911, 2005
- [6] Soo-Yong Shin, In-Hee Lee, Dongmin Kim, Byoung-Tak Zhang: "Multiobjective Evolutionary Optimization of DNA Sequences for Reliable DNA Computing", IEEE Transactions on Evolutionary Computation, 9, 143--158, 2005
- [7] <http://sourceforge.net/projects/circdesigna/>
- [8] kawamata@molbot.mech.tohoku.ac.jp

川又生吹 (東北大学)

64. DNA オリガミの設計

DNA ナノ構造の特徴の一つに、コンピューター上で3次元の構造を予測できる事にある。

これは、蛋白質が1次構造から3次構造の予測が難しい事と比較すると、分子設計の利点となる。設計ソフトとしては複数あるが、ここではBIOMODの提唱者の一人であるShawn Douglas等が構築したcaDNAnoを取り上げる。

■ caDNAno について

2次元, 3次元の構造をGUIベースで設計できるソフトである。無料のソフトであり、現在はver2.2.0(2015年3月現在)。

■ caDNAno のインストール

HPにアクセスし、必要なファイルをダウンロードする。
<http://cadnano.org/>

詳細はHPに記載されているが、

Macでは、Maya2012をインストールした後にインストールする。

windowsでは、Maya2012に加え、Python2.7.2をインストールした後にインストールする。

PCはノートパソコンにもタブレットにもインストールでき、設計だけなら問題はない。ただ、Mayaで3次元構造を表示させる場合は、メモリや画像ボードに余裕があるデスクトップが良い場合もある。

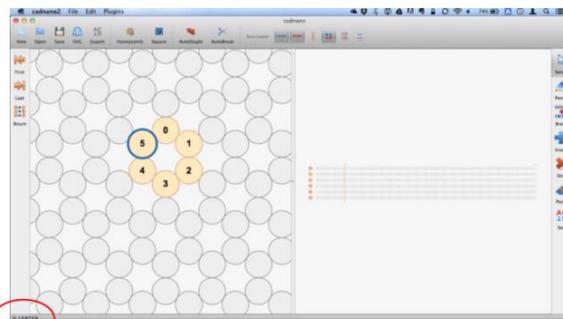
■ caDNAno の使い方

caDNAnoを立ち上げると、2分割されたwindowが立ち上がる。左側がDNAナノ構造体を上から見た図になり、右側がDNAナノ構造体を平面に展開し、横から見た図となる。

まず、左上にあるボタンで"Honeycomb"か"Square"を選ぶ。3次元の構造を作る場合は通常は"Honeycomb"を選ぶ。Honeycombでは、7塩基(240度回転)を基本単位とした構造を設計する(Douglas et al. Nature 2009)。Squareでは、8塩基(0.75回転=270度回転相当。10.67 bp/turn相当)を基本単位とした構造を設計する(Rothemund Nature 2006)。Squareを設計する際は、実際のB型DNAのピッチ

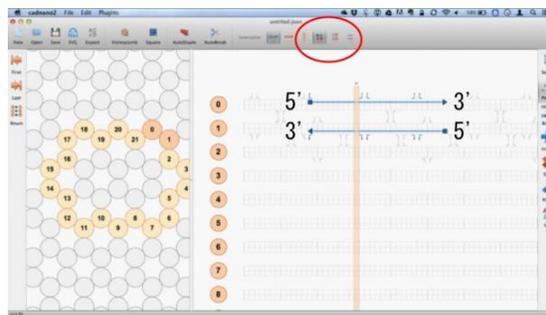
が10.4 bp/turnであり、設計値とずれていることに注意を要する。このため、少しtwistした構造になってしまうので、48塩基毎に1塩基を抜く必要がある(Woo & Rothemund NatChem 2011)。

クリックした順番に番号付きの円柱が作成される。隣接した円柱は連続した番号である必要はないが、最初は連続した番号にした方が作業が楽である。また、左下にマウス位置の座標(円柱番号と塩基番号)が表示されている。



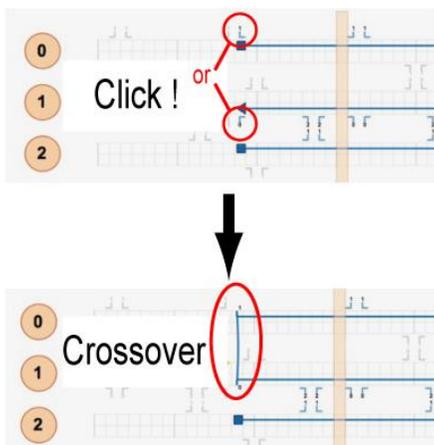
座標

1個の円柱は2段のマス目からなるが、右向きに線を描きたいときは上段を、左向きに線を描きたい時は下段を使う。矢印の四角は5'末端、矢頭が3'末端を現す。この線はscaffoldを現す。"select"やペンを操作する際は、操作対象を絞ると(例えば、scaffoldとendpointsのみとか、赤丸部分)、目的の動作がしやすくなる。

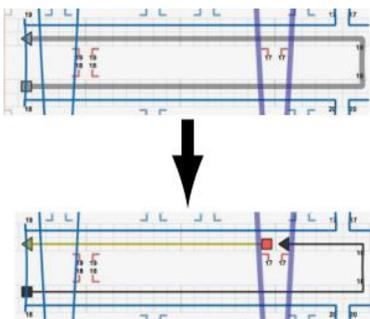


各円柱に対応した線を書いた後は、円柱同士(線同

士)をつなげる操作をする。つなげたい場所の近辺でクリックすると、数字とカギ括弧が現れる。数字は行き先の円柱番号であり、カギ括弧をクリックすると、線が連結され、crossover が形成される。また、余った部分は選択した後に delete キーで削除する。一方で、scaffold を伸ばしたい場合は、選択した後に矢印の四角部分か矢頭をドラッグ&ドロップする。また、crossover を動かしたい場合は真ん中上の selectable で“(X)overs”を選択可能にした後で、操作する。



一筆書きで全部の scaffold をつないだ後は(カギ括弧以外の場所をつなげたい時はペンツールで無理やりつなげる)、staple 鎖を配置させる。やり方は、“AutoStaple”を押して、自動配置させた後、手動で1本1本修正を行う。修正は長さや crossover の位置に関してであり、経験則的な部分が多い。修正すべき staple は太い線に表示される。切断や長さの変更、あるいは再配置を通じて、全ての staple を現実的な長さに変更する。



続いて、具体的な配列を振り分ける。右下の“Seq”ボタンを押すと、scaffold が聞かれるので、適切な物

を選択すると、配列が自動で割当てられる。その際、(意図的に行う場合以外は)、scaffold の塩基が過不足無く割当てられるようにする。

配列は左上の“Export”ボタンを押すと、csv 形式で出力される。その際、sequence が“?”を含む文字列となっている時は、その staple は scaffold とペアになっていないので、(意図的に行っている場合以外は)、staple や scaffold の長さを調節した後に再度“Seq”を行う。

他にも、staple を塗り分ける“Paint”や、1塩基挿入(“Insert”), 1塩基欠失(“Skip”)ボタン等があるので、適時使用する。

■ 構造安定性の確認

MIT のグループが開発した CanDo を用いる。

<http://cando-dna-origami.org/>

配列を upload すると、しばらくして、計算結果を返してくれる。ただし、制約も多いので、参考程度と割り切った使用が良いかもしれない。

■ 配列の注文

合成オリゴサービスの会社に注文する。4 営業日程度で納品される。1本1本チューブに分かれたタイプとプレートタイプがある。

参考文献

- [1] caDNAno マニュアル 東京大学大学院工学系研究科化学システム工学科 村岡恒輝 作
- [2] Douglas SM et al., Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*. 2009;459(7245):414-8. doi: 10.1038/nature08016.
- [3] Rothmund PW., Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*. 2006;440(7082):297-302.
- [4] Woo S, Rothmund PW., Programmable molecular recognition based on the geometry of DNA nanostructures. *Nat Chem*. 2011;3(8):620-7. doi: 10.1038/nchem.1070

多田隈尚史 (京都大学)

65. DNA オリガミのシミュレーション

設計した DNA オリガミが実際にどのような構造になるか、化学実験により検証するにはコストがかかりすぎる。そこで有効になるのが、有限要素法や粗視化分子動力学によるシミュレーションである。期待する構造からのひずみを予測したり、意図的にひずんだ構造を設計したりすることが可能になる。

■ 入力ファイルは caDNAno 形式

DNA オリガミのシミュレータとして紹介するのは、CanDo[1]と oxDNA[2]だ。 どちらのソフトウェアも、DNA オリガミの設計ツールである caDNAno(☞ 64) が出力する json 形式のファイルを入力とすることができる。

例題として、caDNAno 上で図 1 のように表示される一層の二次元 DNA オリガミ構造のシミュレーションを考える。図 1 の構造がマイカ基板に吸着(☞92)した場合、表面と裏面のどちらが上になるか、また設計上不安定な部分はないか、それぞれ考えてほしい。

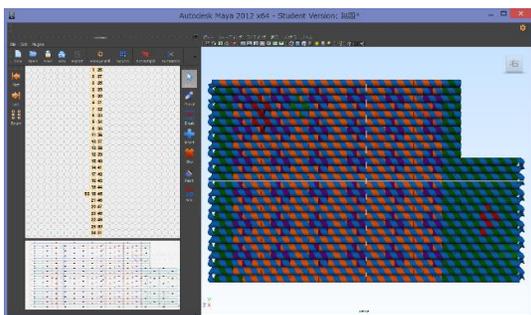


図 1 caDNAno による DNA オリガミ構造

■ 有限要素法を使う CanDo

CanDo はオンラインソフトウェアであり(図 2)、一つの塩基対を一つの要素とみなす有限要素法によるシミュレーションを行う。入力として json ファイル

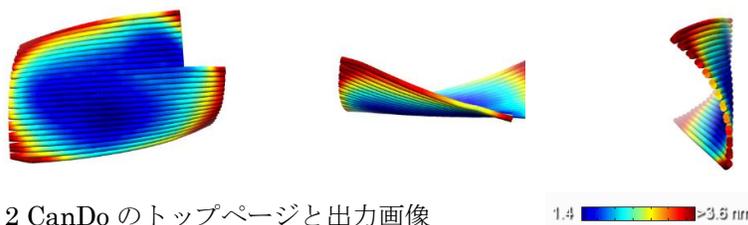


図 2 CanDo のトップページと出力画像

をアップロードし、出力は画像である。動画や pdb ファイル(☞ 66)を出力するオプションもある。シミュレーションを行う大まかな手順は、以下の通りだ。

ログイン(初回はユーザー登録が必要)

「Submit a caDNAno file for analysis」をクリックして、入力フォームへ

それぞれのパラメータを設定する

「caDNAno (.json file)」の項目で入力ファイルを選択する

「Submit」をクリック

パラメータは基本的に最初から設定されているデフォルトの値を用いれば良いが、「Lattice type」は正方格子を用いたか六方格子を用いたかを選択する。動画や pdb ファイルが欲しい場合は、それぞれオプションを設定する。計算には順番待ちが発生し、ファイルをアップロードしてから結果が得られるまでに数時間から数日かかることに注意する。

シミュレーションを行った結果が図 2 である。溶液中で安定となる構造を出力しており、色によってどれだけ熱振動しているか表示される。動画では実際に熱振動している様子が分かる。例題となっている構造では、わずかな二重らせんの位相のずれが蓄

積するため、ややひずんだ構造になる。構造上の特徴から、裏面が上になって吸着しやすいのではないかと予想される。実際に AFM(☞ 18)で観察したところ、およそ 6 割の構造が裏面を上に行っていた。

■ 粗視化分子動力学を行う oxDNA

CanDo より詳しい解析を行えるソフトウェアが、**粗視化分子動力学シミュレーション**を行う oxDNA である。使用されるモデルでは一つのヌクレオチド(☞ 40)を 3 粒子によって表現し、ヌクレオチド単位での動的な変化を理解することができる。シミュレーションの対象はオリガミ構造に限られず、鎖置換反応(☞ 42)などのシミュレーションも可能である[5]。

oxDNA は実行形式で配布されておらず、コンパイルが必要である。またグラフィカルなインターフェースはなく、コンソールからプログラムを実行する必要がある。導入のハードルは CanDo より高いと言える。入力ファイルは独自の形式であるが、json のファイルから変換を行うスクリプトが付属されている。出力は刻々と変化する各粒子の座標などであり、VMD[3]や Chimera[4]などで動画として可視化できる。以下はシミュレーションを実行するコマンドの一例である。

```
python oxDNA/UTILS/cadnano_interface.py  
input.json sq 200
```

```
oxDNA input_relax
```

```
oxDNA input
```

```
oxDNA/UTILS/traj2vis.py xyz trajectory.dat  
prova.top
```

最初の行では、json ファイルを適切なファイルに変換する。2 行目では緩和を行い、3 行目で目的のシ

ミュレーションを行う。温度や時間刻みなどの条件は「input_relax」と「input」に記述されており、ソフトウェアに付属のサンプルファイルを修正して利用する。4 行目では出力されたファイルを可視化するため、別なファイル形式に変換している。マシンパワーにもよるが現在の標準的なパソコンであれば、例えばナノ秒で起こる現象をシミュレーションするのに、実際には数時間の計算時間がかかることに注意する。

シミュレーションを可視化した結果を図 3 に示す。**熱振動によって安定な構造に変形する様子を観察**することができ、構造内の亀裂や、ねじれる部分が見られる。解析を行うスクリプトを記述すれば、二点間の距離などの時間変化を追うことも可能だ。

■ 活用法

古典的な手法でオリガミを設計しただけでは気づかないような情報を得られるため、事前にシミュレーションを活用することで、より精密な設計を行うことができる。また 3 次元モデルが出力されるため、動画作成などに活用することも可能だ(☞ 57,59)。また最新の研究では全原子分子動力学シミュレーションも行われているが[6]、計算コストが高すぎるため、BIOMOD で活用するのは現実的ではない。

参考文献(リンクは 2015 年 1 月に確認)

- [1] <http://candona-origami.org/>
- [2] https://dna.physics.ox.ac.uk/index.php/Main_Page
- [3] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
- [4] <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>
- [5] N. Srinivas, T. E. Ouldrige, P. Sulc, J. M. Schaeffer, B. Yurke, A. A. Louis, J. P. K. Doye, E. Winfree: "On the biophysics and kinetics of toehold-mediated DNA strand displacement", Nucleic Acids Research, 41, 10641--10658, 2013
- [6] J. Yoo, A. Aksimentiev: "In situ structure and dynamics of DNA origami determined through molecular dynamics simulations", Proceedings of the National Academy of Sciences, 110, 20099--20104, 2013

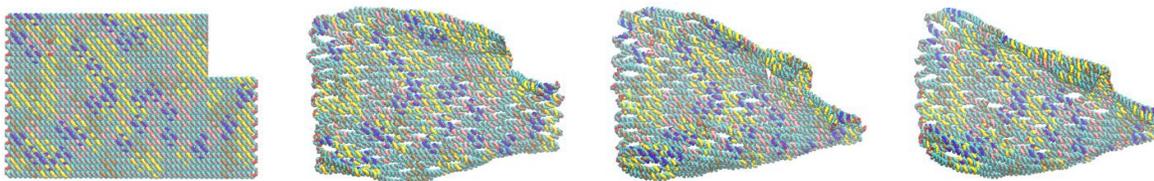


図 3 oxDNA の実行結果

川又生吹 (東北大学)

66. DNA 分子モデル作成

DNA 分子や構造を観察するには、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡が使用される。しかしそれらの装置の解像度を超えて、分子の物性を直接測定することは不可能である。より詳細に分子の振る舞いを理解する上で有効となるのが、3 次元的な分子モデルである。ここでは全原子モデルと二重らせんを使ったモデルそれぞれの作成方法を紹介する。

■ 原子と DNA 構造

DNA 構造を作成する上で、各原子の 3 次元的な配置やらせんの幾何学的な特徴を理解したい場合がある。

しかしながら電子顕微鏡(☞ 85)や原子間力顕微鏡(☞ 85)による観察では、解像度を超えてそれらの情報を直接観察することは難しく、また欠落した情報を復元することは不可能である。

そこで有効となるのが分子モデルの作成である。計算機上でモデルを組み立て、その構造を理解しておくことができる。ここでは DNA の全原子モデルと、二重らせん構造の 3 次元モデルを作成するソフトウェアの紹介を行う。作成した構造は 3D モデルとして動画作成などに利用することも可能である(☞ 57, 59)。

■ 全原子モデルを作成する Namot

DNA 分子は水素・炭素・窒素・酸素・リンの原子から成り、ヌクレオチドと呼ばれる単位が連なっている(☞ 40)。相補鎖が水素結合を作ることで二重らせ

んとなり、幾何学的な情報が加わる。一つ一つの原子の座標を手作業で配置することは現実的ではなく、ソフトウェアを使ったモデリングを行う。

Namot2[1,2]と呼ばれるソフトウェアは DNA の全原子を配置し、二重らせん構造や、さらに大きな構造を作成することができるソフトウェアである。

実行ファイルを直接入手することはできないので、X Windows System がある環境でソースコードをコンパイルする必要があることに注意する。ソフトウェアを実行した画面を図 1 左に示す。単純な一本鎖・二本鎖 DNA であれば、File→Generate を選び、配列を入力すれば全原子モデルが出来上がる。その際に、「B」型の「Deoxy」を選択しておく。

作成したモデルは File→Write を選ぶことで、pdb など、他のソフトウェアで読み込める形式として保存可能である。具体的には VMD[3,4] と Chimera[5,6] というソフトウェアで、構造を読み込み、表示することが可能である。

Namot では「add unit」というコマンドで、どこ

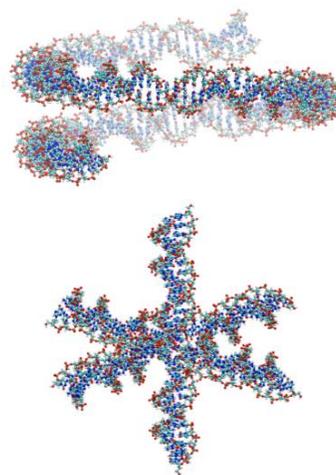
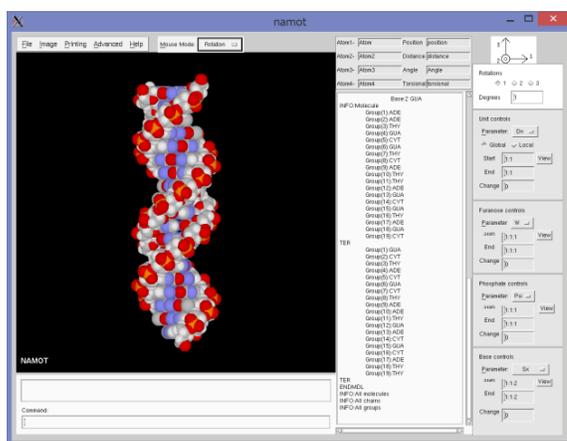


図 1 Namot の実行画面(左)とデモンストレーションの構造(右)

にどのヌクレオチドを配置するかプログラミングすることが可能である。詳細はオンラインのマニュアル[1]などを参考にしてほしい。Namot に付属しているデモンストレーションのファイルから構造を作成し、VMD で可視化したものが図 1 右である。二重らせんがらせんを巻いた構造や、上下左右前後に二重らせんが伸びた分岐構造などを作ることができる。

最新の研究では DNA オリガミの全原子モデルに関する研究も始められており、図 2 のように、caDNAno ファイルから全原子モデルを作ることが可能である(東北大学で作成)。

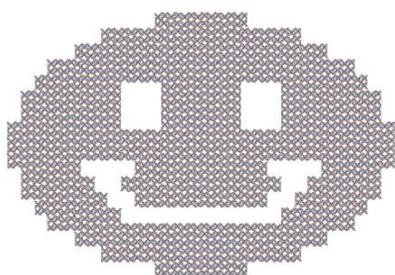


図 2 DNA オリガミの全原子モデル

■ 分子動力学

作成した全原子モデルを元に、古典物理に基づいた分子動力学シミュレーションを行うことができる。

シミュレーションソフトウェアとしては、NAMD[7]、Amber[8]、Charmm[9]などが有名である。

NAMD のチュートリアルに pdb ファイルが入力となる DNA の分子動力学シミュレーションがあり、参考になる。温度を上げた状態でシミュレーションを行い、二重らせんの解離過程を観察したのが図 3 である。モデルの大きさや計算機のスペックにもよるが、全原子分子動力学は計算コストが大きいことに注意する。

■ らせん構造を作成する Nanoengineer-1

全原子モデルほど詳細な構造が必要ない場合に有効なのが Nanoengineer-1 である[10]。T-motif による

車輪構造[11]をモデリングした実行画面を図 4 に示す。Build→DNA→Insert DNA を選択することで、DNA と同じ幾何学的構造を持った二重らせんの 3次元モデルを作成することができる。異なる方向を向いたらせんの作図、末端の切断や接続などを直観的に行える。らせんの位相やピッチのみが重要な設計においては有効なソフトウェアである。

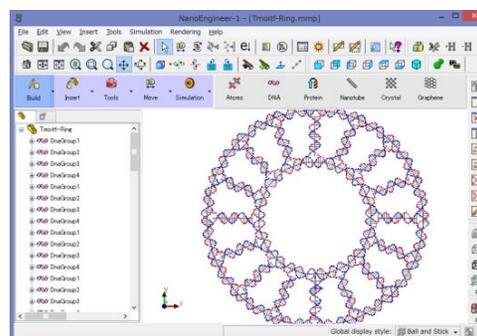


図 4 Nanoengineer-1 の実行画面

参考文献

- [1] <http://namot.sourceforge.net/>
- [2] Eugene S. Carter, Chang-Shung Tung: "NAMOT2 - a redesigned nucleic acid modeling tool: construction of non-canonical DNA structures", Computer applications in the biosciences: CABIOS, 12, 25--30, 1996
- [3] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
- [4] William Humphrey, Andrew Dalke, Klaus Schulten: "VMD: Visual Molecular Dynamics", Journal of Molecular Graphics, 14, 33--38, 1996
- [5] <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>
- [6] Eric F. Pettersen, Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, Thomas E. Ferrin: "UCSF Chimera - A visualization System for Exploratory Research and Analysis", Journal of Computational Chemistry, 25, 1605--1612, 2004
- [7] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>
- [8] <http://ambermd.org/>
- [9] <http://www.charmm.org/>
- [10] 開発が中止されているが、次の URL から Windows で実行可能なスナップショットが入手可能である。
<http://diyhpl.us/~bryan/irc/nanoengineer/snapshots/>
- [11] Shogo Hamada, Satoshi Murata: "Substrate-Assisted Assembly of Interconnected Single-Duplex DNA Nanostructures", Angewandte Chemie International Edition, 48, 6820--6823, 2009

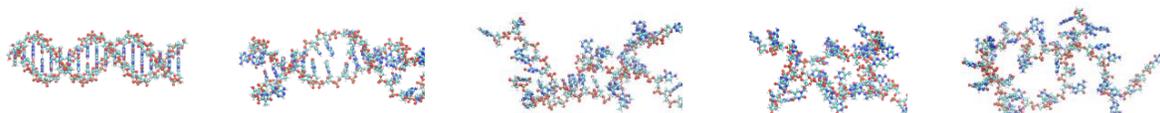


図 3 NAMD による分子動力学シミュレーション

川又生吹 (東北大学)

67. DNA 論理ゲートシミュレーション

情報処理を行うシステムを、DNA を使って実装する研究が盛んに行われている。しかしシステムの規模が大きくなるにつれ、システム的设计や解析は難しくなる。事前にシステムの挙動を予測することでそのような問題は解決する。数値解析により DNA 鎖置換反応をシミュレートできるソフトウェアを紹介する。

■ DNA 論理ゲートと化学反応式

DNA を入出力とする論理ゲート(☞ 29)や振動子(☞ 33)の開発が進んでいる。それらのシステムでは複数の化学反応が同時に進行しており、定量的にその挙動を予測することは困難である。また既存のゲートを拡張して大きなシステムを設計する際に、新しく導入した配列が元のシステムに干渉してしまい、予期しない反応が起こってしまう可能性がある。

そこで化学反応式に基づいた数値シミュレーションを行い、システムがどのように振る舞うかを事前に予測する。 予測の際には、反応速度論に基づき常微分方程式を立て(☞ 39)、数値解析ライブラリ(☞ 60)などを用いて連続的・決定的シミュレーションを行う[1,2]。リポソーム(☞ 89)などにコンパートメント化され、分子数が少ない環境については、離散的・確率的なシミュレーションを行う。

登場する分子種が多くなると、微分方程式に表れる変数の個数も大きくなり、繰り返し人手で立式と解析を繰り返すことは難しい。また反応速度定数などのパラメータを決定する手法も必要になる。

DNA 反応の場合、素反応が鎖置換反応(☞ 42)や酵素反応(☞ 45)に限定されるため、そのような立式・解析の過程を自動化してくれる設計支援ソフトウェアが存在する。酵素反応を使った振動子などのシステム的设计とシミュレーションには、DACCAD と呼ばれるツールが有効である[3](☞ 33)。グラフを使った直観的な操作が特徴である。

■ 設計・解析支援ソフト DSD

本項では、酵素を使わず、鎖置換反応だけ進行する論理ゲートの設計とシミュレーションを行えるオンラインソフトウェア「DSD」[4,5]の紹介をする。

DSD は Microsoft Research が開発したオンライン

ソフトウェアであり、[4]の URL の右側にある MAIN をクリックすることで起動する。同じく右側のやや下に、チュートリアルやマニュアルへのリンクがあり、詳細や不明点はそちらを参照する。以降は基本的な使い方の説明を行う。

■ DNA の記法

DSD では独自の記法で DNA を表す[6]。マニュアルに書かれた例題を図 1 にまとめた。ドメインには文字または数字を割り当て、その相補鎖には「*」をつけ、短い足がかり配列には「^」をつける。右向き一本鎖は「<>」、左向き一本鎖は「{ }」、二本鎖は「[]」で囲う。左向き一本鎖による連結には「:」、右向き一本鎖による連結には「::」を用いる。

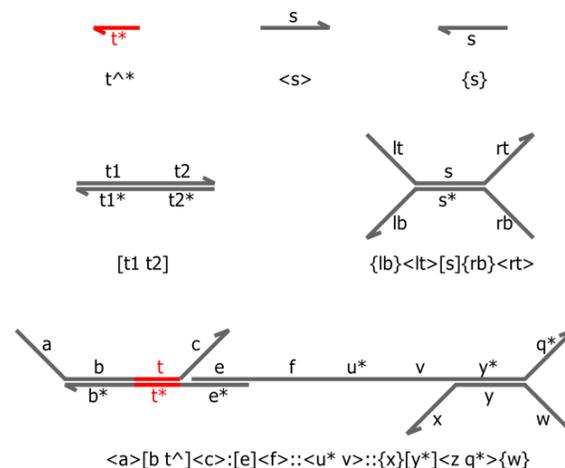


図 1 DNA の構造と、対応する記法

■ 入力ファイルのプログラミング

初期状態で各分子がどれだけの濃度があるかをプログラムとして左側の Code 内に記述し、ソフトウェアへの入力とする。プログラムにはさらに反応速度定数や、シミュレーション時間、グラフに表示する分子などを指定できるが、詳細は省略する。ソフト

ウェアには様々なサンプルプログラムがあり、Examples から Catalytic を選べば、増幅ゲート(31)のプログラムが読み込まれる。

例題として、図 2 の上側のような分子と濃度を初期状態とした AND ゲートのシミュレーションを考える。対応するプログラムは図の下側に記述してある。最初の 6 行で変数の定義を行い、最後の行で初期状態を表している。初期状態は「()」の中に「|」を区切りとして、分子の濃度と種類を記述する。

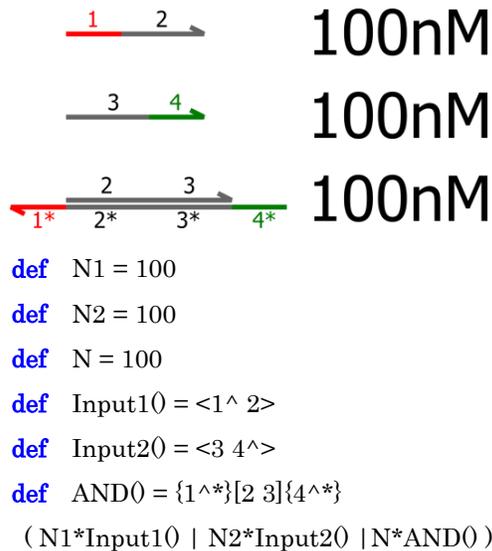


図 2 初期状態の図とそのプログラミング

■ コンパイルと数値シミュレーション

プログラミングが終われば、まずはコンパイルを行う。上部左側にある Compile と書かれたボタンをクリックする。正しくプログラムが記述できていない場合はこの段階でエラーが出るので、修正を行う。コンパイルを行うと、初期状態からどのような構造ができるかを調べ上げ、常微分方程式を立てる。右下ウィンドウの Compilation の Graph タブを選択すると、図 3 の上部のように、反応経路をグラフとして表示する。

その後、隣にある Simulate と書かれたボタンをクリックすると、数値シミュレーションの結果が表示される。パラメータを指定しない場合はデフォルトの値が適応される。またデフォルトでは確率的シミュレーションの Stochastic になっているが、Deterministic にすると決定的シミュレーションに変わる。右下ウィンドウの Simulation の Plot1 タブを選択した結果が図 3 の下部であり、横軸が時間、縦軸が濃度を表す。様々なオプションがあり、上部右側の Compilation や Option を変更して詳細なシミュレーションを行うこともできる。

このソフトウェアは、濃度の時間発展を予測することができ、システム的设计や解析に役立つ。

このソフトウェアは、濃度の時間発展を予測することができ、システム的设计や解析に役立つ。

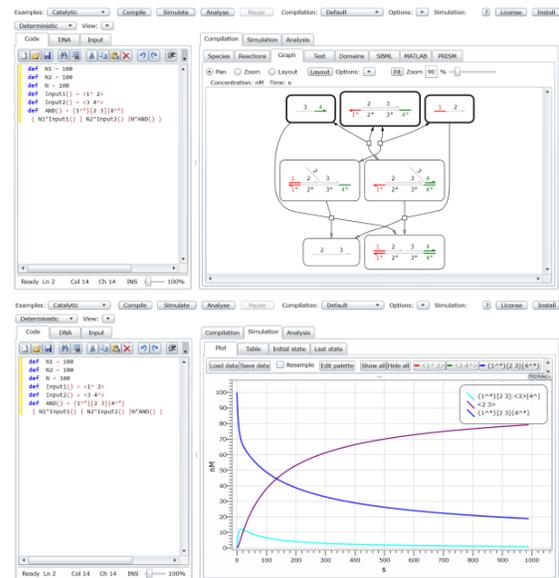


図 3 コンパイルとシミュレーション結果

参考文献

- [1] Lulu Qian, Erik Winfree: "A simple DNA gate motif for synthesizing large-scale circuits", Journal of the Royal Society Interface, 8, 1281--1297, 2011
- [2] Kevin Montagne, Raphael Plasson, Yasuyuki Sakai, Teruo Fujii, Yannick Rondelez: "Programming an in vitro DNA oscillator using a molecular networking strategy", Molecular System Biology, 7, 466, 2011
- [3] Nathanael Aubert, Clement Mosca, Teruo Fujii, Masami Hagiya, Yannick Rondelez: "Computer-assisted design for scaling up systems based on DNA reaction networks", Journal of the Royal Society Interface, 11, 20131167, 2014
- [4] <http://research.microsoft.com/en-us/projects/dna/>
- [5] Matthew R. Lakin, Simon Youssef, Filippo Polo, Stephen Emmott, Andrew Phillips: "Visual DSD: a design and analysis tool for DNA strand displacement systems", Bioinformatics, 27, 3211--3213, 2011
- [6] Andrew Phillips, Luca Cardelli: "A programming language for composable DNA circuits", Journal of the Royal Society Interface, 6, S419--S436, 2009

川又生吹 (東北大学)



Pop-up Pirate 福岡工業大学 2014 年

第7章 実験テクニック

68. 概論：実験するとはどういうことか

現実空間での検証，が実験であり，仮説を証明するための科学の強力な手段のひとつである．実験をせずに勝った BIOMOD Team の例はない．実験を通じて得られたのは事実であるため，「ほんとうのこと」に近づいた感が，他人を安心させ，実験者の満足させ，次の仮説を立てる役に立つ．

■ 実験とは何か

ひとは，なにかを主張して認めてもらいたい生き物であり，そして，安心して他人の主張を認めて，そりゃすげえな，と言いたいようだ．主張と納得をつなぐ場所に，科学の方法として「実験」がある．

UFO っているの？という疑問に対して，俺見たよ，って主張するのは自由なのだけれど，「お，おう」という反応以上に納得してもらうには証拠が必要だ．その UFO はじつは俺が作った，これが設計図でこれが飛行記録で，これが現物だ，と公開されると，ちょっと「おっ」となる．ほかの誰かがその設計図をもとに作って飛ばした記録が公開されると，だいぶ「おおおっ」となる．もう未確認でもなんでもないただの FO だが，この例は生体分子デザインコンテストにもそっくりあてはまる．

主張，つまり立てられた仮説が正しいということを検証するための強力な手段が「実験」である．実験は，人為的に，ある一定の条件を設定して，自然法則のもとで対象がどうふるまうか，を調べる行為であり，あるがままを記録する「観察」と異なる．そして自然は嘘をつかないので，ダメな結果というものではなく，あるのはダメな実験なのだ．

■ よい実験とはなにか

再現性の高い実験である．

■ 悪い実験とはなにか

再現性の低い実験である．

■ よい実験のための 6 要素+1

つまり，俺は UFO をつくって飛ばす実験をした，設計通りに飛んだ，といった主張は，第三者に再現されることで強化され，安心されやすくなる．再現性を高めるためには，信頼できるデータに基づき，仮定と手法と結果と考察とがそろって明確に記述され

公開されることが必要である．信頼はすべてを実験ノートに記録することで保持され，データは，可能な限り多くの人が誤解なく理解できる手段，現状では「数字と単位」で表現することが求められる．これらが満たされた報告からは，第三者が主張を支持するための追実験を行うことができ（検証可能性），主張を懐疑し否定するための実験も考案することができる（反証可能性[1]）．主張の支持と懐疑とを事実に基づいて繰り返してゆき，確からしさを高めてゆくことが科学の方法であり，人類のすてきな発明品である．捏造は末代まで祟る．そして数字の間をつなぐ記述言語は（みんなに伝わるならエスペラントでも C 言語でも良いが残念ながら現状）「英語」のテキスト+静止画+動画が標準になっている．

そして昨日の自分は他人，実験ノートは必ずつける [2]（大事なことなので 2 回書きました）．

■ 実験の組み立て方つれづれ

仮説は好き勝手に立てられる．月は実は萩の月 [2] ではないか？しかしよい仮説と悪い仮説がある．事実に基づく論理的な仮説がよい仮説であり，飛躍は少なければ少ないほどよい．よい実験のためには，仮説を過不足無く証明するにはどうすればよいか，という結果から逆算して，実験計画をたてる．月と同じ大きさの萩の月をつくって 38 万 km 上空に浮かべる試験は筋が悪い，大人しく萩の月の密度を測ろう．定性的な実験から定量的な実験へと進める．この水は辛い／辛くない，という定性的(Qualitative)な表現に対して，NaCl 濃度が 1.01M/1.00nM，という表現は定量的(Quantitative)と呼ばれる．定量的な実験とは，ある性質を示す条件を量的に規定して確かめたものであり，再現性がよい．定性的な評価が確立している現象に対して，定量的な評価を行うとい

う順に進めると効率よく、より深く現象を理解することができる。月を 10m 掘っても 1km 掘ってもきつと温泉は出てこないだろう。

定量について、この世の現象の絶対値を求めることは大概困難だが、他と比べてどうか、という相対評価は大概容易である。正確な光速の測定は大変だが、大気中での音速やウサイン・ボルト 100m 走との比較は簡単だ。この、他と比較してなにかいうための実験を対照実験（コントロール実験）とよぶ。まず、おおざっぱ（濃度を対数スケールで、など）に条件を振って、現象の傾向を定性的につかむ。実験を行っていて一番わくわくするところだ（個人の感想です）。現象を掴んだなら、次は定量的な評価を行う。濃度域、試行回数 3 回以上で平均値、標準偏差を求め再現性を高める（☞ 69）。原因を考え、仮説を立て（あそこのパーツがまずいのでは？）、検証実験を立案・実行し、結果から修正した仮説をたて、検証実験を立あ...そしてメ切はやってくる。たかだか 80 年の人生のたった半年の BIOMOD は短期決戦になる。少ない回数の実験で、できるだけ多くの事実を明らかにするよう設計することも重要である。そのためにはやはり仮説が重要であり、仮説をたてるためにどの事実を採用するか？が重要であり、事実を選別し見極める目利きの才が求められる（これは鍛えられる）。事実の材料は生データに最も近い一次情報報である論文が最良で、そこに自由にアクセスできる最寄りで安価な機関は現状、大学である。権利は最大限、積極的に活用しよう（☞ 15）。

■ 実験のケーススタディ

F 博士は、細胞のパーツから生命が再起動できるのではないかと仮説を立てた。そこで、いったんばらばらにした菌を再構築してみるという実験を試みた。実験デザインはどうなるだろう？まず定性的な評価を考える。要素として、1) 菌の中身、2) 市販の無細胞タンパク質合成試薬、3) これらを包むリポソーム（☞ 89）がある。これらを組み合わせ、寒天培地に播き、一晚恒温培養後、その結果菌のコロニーができるかどうかで評価する。要素を加える/加え

ない(+/-)の 2 状態で、 $2^3=8$ サンプルとなる。マトリクスは下記ようになる。

Sample No.	A	B	C	D	E	F	G	H
要素1	+	-	-	+	-	+	+	-
要素2	-	+	-	+	+	-	+	-
要素3	-	-	+	-	+	+	+	-

G 以外すべてコントロール実験である。H は俗にスーパーコントロールなどと呼ばれるが侮るなかれ、培地など環境のチェックになる。現実にはサンプル量も予算も時間も限られるので、論文など過去の知見を参考に重要度の高い項目から検証することになる。過去の知見より、各要素単独から生命が発生した例は？ない(A, B, C, H)。そこで、低価格のコントロールから A, C, F, G, H を試す。結果、G にだけ菌のコロニーが確認された。すわ生命の再起動か！相棒の N 博士は勝手に盛り上がりすぎてあすにでも記者会見とか言い出す。F 博士はそれをどうにか落ち着かせ B を試してみる。するとやんぬるかな、コロニーが確認されたのだ。市販の試薬に菌が混入していた、というオチである（この話はフィクションだがフィクションでない部分もある）。調べたい要素の組み合わせは有限なので、効率よく原因を追い込もう。

■ 最後にいちばん大事なこと

実験には、多かれ少なかれ危険が伴う（☞ 70）。DNA オリガミ 1kg を誤って飲み込んで安全かどうかは誰も知らないし、5kg のプルトニウムを臨界させるとどうなるか誰も知らなかった昔がある。考え抜いて、やらずにすむ実験はやるべきでないのだ。無事に終え、後片付けをして結果を公表するまでが実験なのだ。

ご安全に。

参考文献

- [1] 科学哲学者カール・ポパーによる科学の定義。
- [2] ラボノートの書き方【改訂版】、羊土社、(2012)。など
- [3] 仙台銘菓。夏は凍らせても美味しい

野村 M. 慎一郎（東北大学）

69. 実験の組み立て方

自分達のアイデアや論理を主張するには、仮説を立て、実験によって検証することが重要である。そのためには、どのような計画を立て、実行していく必要があるのか。本章では、実験計画の立て方から、いかに実行するかについて記載する。

■ なぜ実験計画を立てる？

BIOMOD で優勝するには当然、実験を行う必要がある。それも、かなりの実験量を短期間で的確に行うことが求められる。実験・研究を行うためには、試薬や消耗品などを購入するためのお金（研究費）や測定・解析するための機械・装置が必要である。研究費を無駄にすることなく、また限られた範囲内で的確な装置を使用して実験を進めるためにも最良な実験計画を立てることが大事である。もちろん学生だけで、完璧な実験計画を立てることは、ほぼ不可能と思われるので、ぜひメンターの先生方にアドバイスを貰いながら実験計画を立てることをお勧めする。しかし、メンターの先生方におんぶにだっこ状態ではダメ！！、先生方に相談する前に出来る限り自分たちで、アイデアを練り上げてもらいたい。そこで、まずは自分達で、計画書を作製すると良いだろう。理由はいくつかあるので、箇条書きにする。

- (1) 自分達がやりたいテーマ・目的を整理できる
- (2) 問題点・課題がハッキリする
- (3) テーマ・目的が途中で曖昧になるのを防げる
- (4) 実験しながら改訂していくことができる
- (5) 研究をまとめる基になる
- (6) 後輩達の道標になる

これ以外にも、実験計画を立てることの意義はありそうだが、学生側が良い研究計画を立てることが出来れば、メンターの先生方（先生方は研究のプロ・百戦錬磨の猛者たち）も的確なアドバイスをくれるであろうし、自分達が思いもつかない素晴らしいアイデアを授けてくれるかもしれない。

■ 実験計画を立て、実行する

ここからは実験計画の立て方についてステップごとに記載する。

ステップ1：テーマを決める

まずは大まかで良いので、自分達が何を行いたいかはっきりさせる必要がある。過去のBIOMOD のテーマと重なることが無いように注意（過去の大会のHPを見ると良い）して決める。

ステップ2：実験方法・スケジュールを決める

どのような実験をどのような工程で行えば目的を達成できるかを考える。この時、過去の文献を調べるなどの予備調査や実験方法のマニュアル本などを読み工程表を作製する。この時に、どのような試薬が必要で、どのような装置で測定・解析するかをリストアップする。リストアップすることで、メンターの先生方と相談するとき、研究費の予算や装置の使用が可能かどうか迅速に決めることが出来る。

この段階で、一度メンターの先生方に確認を取ると良い。当然、厳しいコメントが返ってくるかもしれないが、めげずにアドバイスを消化しながら、自分達のオリジナリティを模索することが大事である。

ステップ3：計画が出来たら即遂行

メンターの先生方からのアドバイスを基に、テーマが決定したら、あとはただひたすらに実験に打ち込むことが重要である。世界中の学生を相手に、優勝するにはひたすらストイックに実験に打ち込むことが重要である。

■ 対照実験

実験を行うことで、自分達が主張する論理やアイデアを証明することが重要ではあるが、そのためには比較するための対照実験（コントロール実験）が非常に重要である。BIOMODに限らず、研究の世界ではコントロール実験を正確に行えることが研究者としての資質を評価するうえでも重要な指標である。それぐらい、コントロール実験は重要なので、BIOMODに参加する学生も肝に銘じて、常に実験する時にはコントロール実験を行うことが重要である。

では、コントロール実験の取り組み方について、例を挙げながら記載する。コントロール実験には2種類あり、ネガティブ（陰性）コントロールとポジティブ（陽性）コントロールである。それらの例は68を参照するとよい。

70. 安全について

化学実験には危険がつきものである。自分自身の身を守るため、また他人に迷惑をかけないために、安全に関する備えをして実験に臨む必要がある。本稿では、実験をするにあたって、①具体的に何が危険なのか、②危険防止のために何をすべきか、③万一事故が起こったらどうするか、の3点について説明する。

■ 化学実験と安全

化学実験には危険がつきものであるから、とにかく「安全第一」で、自分の身は自分で守るという意識を持つよう心がける必要がある^{[1][2]}。安全に関する備えを忘れて実験を行い、事故などを起こせば、自分が辛い思いをするだけでなく、他人や、研究室全体、大学全体にも迷惑を及ぼす。したがって、具体的に何が危険なのかを理解した上で、十分な危険防止策をとり、万一事故が起こった場合にどうすれば良いかを事前に確認しておくことが必要である。

■ 具体的に何が危険いか

研究室は危険だらけである。標準的な化学実験室内の危険要素を図1にイラストで示した。化学物質、化学反応、窒息性ガス、高圧ボンベ、真空・加圧系、ガラス器具の破損、放射性物質、X線、紫外線などによって、怪我、火傷、窒息、被爆、中毒、健康被

害などが起こりうる。ひどい場合には、失明、手や指の切断、大爆発、死に至る事故などが、実際に起こっている。化学物質の吸引や放射線被爆の場合、その場では何とも無いようでも、長期間にわたって快復できない障害が残る場合（生殖器の異常、発がんなど）があり、特に注意を要する。「アセチレンガスの爆発で建物のフロアが全部吹き飛んだ」「密閉状態のガラス容器が破裂して破片で指を切断した」「水酸化ナトリウム溶液が目に入り失明した」など、実際のゾツとするような事故の例は書籍^[3]やネット上に沢山ある。事例を知っていると実感が湧くので、一度は安全についてのゼミなどを行いながら、これらの情報に触れておくことをお勧めしたい。

■ 危険防止のために

自動車の運転と同じで、常に危険予測しながら実験を行うことが肝要となる。万一の事故の際に対応が

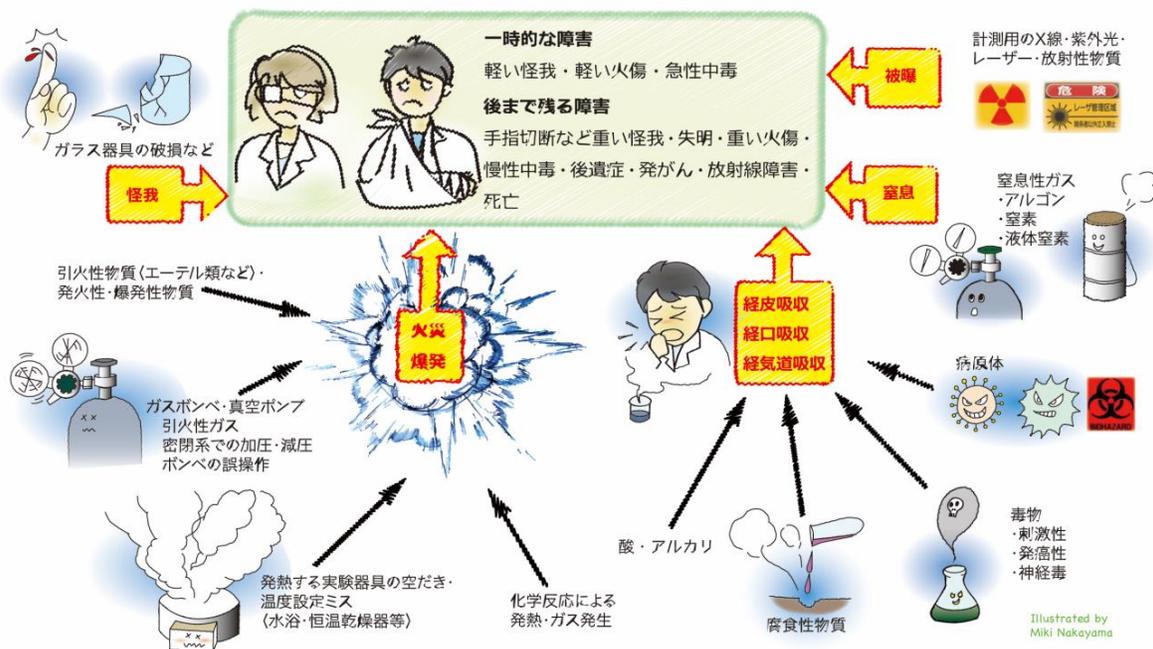


図1. 化学実験室の危険要素

出来ないので、1人では実験をしないということも大事である。特に、実験に慣れないうちや新しい種類の実験を行う場合は、必ず経験のある研究者と一緒に行うべきである。一方、慣れてくると逆に、気を抜いたり安全対策を省いてしまったりするので、慣れてきた頃こそ、注意を怠らないよう肝に銘じる必要がある。

また、個人の状況も考慮すべきである。徹夜明けなどで疲れがたまっていれば、集中力が低下し、事故を起こす可能性が高くなる。このようなときは、実験などすべきではないが、やむをえなければ、指導者に相談したうえで、必ず複数人で実験を行うべきである。

一方、重大な事故が1件おこった場合、その背景に軽微な事故が30件はあり、事故ではないがヒヤリとするような事例が300件は起こっているとすると、統計学的な検証結果がある。これはハインリッヒの法則(またはヒヤリハットの法則)と呼ばれる。人によっては、おっちょこちょい、物忘れをしやすい、注意散漫な性格の人もいるであろう。日常生活で、ヒヤリとすることが多い人は、実験の時には特に意識的に、危険防止策を講じるべきである。

また自分が安全対策をしていても、他人の事故に巻き込まれる恐れもある。したがって、実験室の中にいるときは、常に、危険への備えを解くべきではない。例えば、ヘッドホンで音楽を聴きながらデータ整理をしていたら、危険を知らせる声が聞こえない。白衣を着用していなければ、他人が飛散させた薬品が直接降りかかってくるかもしれない。

■ 危険防止のための具体的な対策

研究室での危険防止のために一般的に注意すべき事を以下に列記しておく。

- ・手袋、ゴーグル、白衣着用、靴(サンダル不可)
- ・化学物質の情報収集(MSDS情報の検索)
- ・実験に集中:休憩・お喋り・携帯は実験室外で
- ・実験中にその場を離れるときは、実験者や実験内容を明示し、連絡が取れるようにしておく
- ・コンタクトレンズ不可(薬品が目に入ると危険)

・イヤホン禁止(危険を知らせる声や音が聞こえない)

・飲食禁止・喫煙禁止(化学物質の経口吸収防止)

・深夜・単独実験禁止(助けが呼べない)

・発熱する実験器具は暴走や空だきで火災の原因になり得るので、終夜運転などは特に注意

・薬品をこぼした場合はすぐに拭き取る(放置すると、自分や他人が触れてしまう可能性がある)

・消火器、シャワー、救急箱の場所の確認

・ガスボンベの取扱い(逆ネジ、転倒防止など)

■ 事故が起きてしまった場合の対応

危険防止策を講じていても、完璧はあり得ない。他人の事故に巻き込まれたり、遭遇することもある。

以下に記すような事故の対応をあらかじめ確認し、被害を最小限にとどめるようにしたい。

・応急処置:一刻を争う応急処置が必要な場合がある。目や皮膚に、酸、アルカリ、その他の危険な毒劇物がついた場合や火傷をした場合、水道や緊急シャワーの流水で十分に洗い流す。出血が有る場合は、圧迫して止血の処置をする。

・助けを呼ぶ:近くにいる人、周囲の研究室、大学の警備室、119番通報に、救助を要請する。

・報告など:爆発や火災など目に見える大きな被害があった場合はもちろんだが、放射線被爆や少量の化学物質が目や口に入った場合や、軽い怪我では、その場では何とも無くとも、前述したように、後遺症や慢性中毒につながる可能性もありうる。軽微な事故であっても報告し、医師の診断を念のため受けておく。後日、保険請求などのためにも必要となる。

参考文献

[1]「新版 続 実験を安全に行うために」化学同人編集部編,1993年

[2]「第4版 化学実験の安全指針」日本化学会編,丸善株式会社,1999年

[3]「実験室の笑える?笑えない!事故実例集」田中 陵二・松本 英之 著,講談社サイエンティフィク,2001年

宮元展義,中山美紀(福岡工業大学)

71. プロトコルの読み方

実験を行うときには、まずは他の研究者が作成したプロトコル（実験操作手順）を参考にすることが多い。論文などに記述してあるプロトコルを上手に活用するには、その各手順の意味をよく理解した上で、自分の環境や目的に合った“自分用のプロトコル”に作り直して行く必要がある。

■ プロトコルとは

生物化学系の実験では、実験手順のことをプロトコル(protocol)と呼ぶ。研究は、どんなに新しい研究であっても、過去の研究と何らかの形で関連している。したがって、具体的な実験計画を立てる際には、過去の論文などの実験手順を少なからず参考にすることになる。しかし、それには少しコツも必要である。本項では、論文などのプロトコルをどのようにして活用したらよいのかについて概説する。

■ プロトコルの使い方

プロトコルは、料理で言えばレシピに相当する。同じレシピがあれば、どこでも誰でも、同じ料理が作れるだろうか？そうはいかない。なぜかという、料理人の腕や経験（レシピに書かれていない下処理、食材の切り方、手際の良さなど）や調理器具の善し悪しが影響するし、同じ名前の食材や調味料であっても千差万別だからである。

科学論文は厳密なものなのだから、料理のような曖昧なことではないのでは、と期待するかもしれない。しかし、実はそうでもなくて、実験のプロトコルも案外あてにならない。調理器具に相当する器具や装置は、研究室によって微妙に異なる。研究室で蓄積された基本操作のノウハウや、実験者自身の技術や経験も異なる。また、プロトコルの筆者が未熟なため、あるいはノウハウを隠すため故意に、記述されたプロトコル自体が不完全な可能性がある。したがって、異なる環境の実験室で、ましてや実験初心者が、プロトコルに沿って実験をしようとしても、うまくいかないことが多い。そもそもプロトコルに沿って実験できるように準備をするだけでも、意外に大変なことである。プロトコルを上手に活用して実験を進めるには、以下の点に留意すべきである。

(1) 理解する

まずは、プロトコルに書かれている各操作手順の意味を、可能な限り、理解する努力をすることが重要となる。各操作の意味を理解していなければ、どのくらいの厳密な精度が要求されるのかも分からないし、自分の研究室の環境に合わせた具体的な実験操作を考えたり、自分の実験目的に合うようにプロトコルをアレンジしていくことも出来ない。また、うまくいかなかった場合に、どこをどう改善すれば良いのかも分からない。

まずは、聞いたことのない操作や実験手法が書かれている場合もあるだろうから、それらが何を意味するのか、基本操作を解説するような書籍などを利用して、調査する必要がある。

また、各操作の段階で、どのような反応が、どのような機構で起こっているのかを理解しておく必要があるだろう。さらには少し難しくなるが、温度・反応時間・濃度などの条件設定が、何を意図して設定されているのか、分かる範囲で考えておく必要がある。

(2) 自分用のプロトコルに作り直す

プロトコルは、あくまで、そのプロトコル著者の実験環境、実験技術レベル、実験目的を想定しているはずである。自分の研究室で、実際にどのような具体的な実験操作として実行できるのかを考え、自分用のプロトコルに作り変えていく作業がどうしても必要である。また実験操作の細部の記述が省略されていたり、曖昧に記述されていたりする場合、それを自分たちのノウハウや経験、調査によって補って行かなければならない。自分の研究室では難しい手順が含まれている場合は、代替の手段を考える必要がある。

例えば「窒素雰囲気下で、A と B を混合し、温度 30℃に保って1分間攪拌した」などと短い記述であつても検討しなければならない事は沢山ある。窒素雰囲気をどのようにして作るか、攪拌は手ですかヴォルテックスミキサーを使うか、温度の制御には研究室にあるどんな装置が使えるか、等々である。温度や試薬量などに、どのくらいの精度が求められるのかも、実験内容によって異なる。このあたりは、経験や研究室の流儀、ノウハウ、設備にも左右されるので、先輩や先生に相談しながら決めていく必要がある。

しかし、どんなに緻密に計画しようとしても、実際にやってみないと分からないことも多い。初めての実験を、いきなり完全に成功させることは難しいので、あまり気むずかしく考えるよりも、まずはおおざっぱに出来る範囲で実験をしてみて、そのあとで改善していくのが普通だろう。

なお、経験の無い実験操作や基本操作をする必要があれば、まずその実験操作自体を理解して、ダミーのサンプルを使って練習し、操作に習熟しておいたほうが良いだろう。

(3) オリジナルからのアレンジ

最初は、やむを得ない部分を除いて、論文に記載されているオリジナルな方法に出来る限り忠実に、試薬、反応時間、器具、装置、スケールを設定して実験を行うべきである。「反応が遅そうだから温度を高くしておこう」「試料が沢山欲しいから、実験スケールを大きくしてみよう」「A の溶媒が手元にないから代わりに B の溶媒で」「この操作は面倒で意味がなさそうだから省略してしまおう」「1分攪拌と書いてあるが念のため10分攪拌しよう」「A、B、Cを順番に加えることになっているが、全部一度に混ぜてしまおう」など、いろいろと変更したくなるかもしれない。それで問題ない場合もあるかもしれないが、そもそも、ただでさえ、プロトコル通りに実験をしてもうまくいかないという場合が多々ある。成功する目処が立つ前に、実験操作の一部を変更してしまつては、失敗の原因がますます分かりにくくなるだ

けである。

一方、実験がうまくいく目処がいたら、各操作の意味をよく考えながら、自分の研究環境や研究目的に合わせて、プロトコルをアレンジしていくことが大事である。

■ プロトコルはどこに書いてある？

論文には大きく分けて、詳細な実験結果を記載する full paper と、重要な研究成果を速報する communication や letter がある。full paper の場合は、Introduction 項目の後に Experimental あるいは Method などの項目を設けてプロトコルが書かれている。Communication 論文の場合は項目分けされていないので探しにくいかもしれない。論文の最後 (Conclusion の後) に記述されている場合や、論文本体に詳細な実験方法を記述せず、出版社のホームページからダウンロードできる「Supporting Information」に記述している場合もある。

参考文献

[1] 日本化学会編「実験化学講座 (全31巻)」, 丸善出版

72. DNA のオーダーの仕方

一昔前までは、化学合成した DNA は高い試薬に分類されていたが、PCR 法の普及にともなう需要の増大と、何十本も同時に DNA を合成できるマルチアレイ型の DNA 合成機の開発により、今日では非常に安価にカスタム合成 DNA を入手できるようになった。何社か実例を挙げて、その注文の仕方を説明する。

■ 代表的な DNA 受託合成会社

カスタム配列の DNA の受託合成を行っている会社はいくつかあるが、それぞれ得意分野が少しずつ違っている。価格は 2015 年 3 月現在。

1. シグマアルドリッチ

http://www.genosys.jp/index_n.html

国内（北海道）製造の DNA オリガミに使用できるプレートオリゴ（最大 45 mer）も注文可。製品は高品質で信頼できるが、値段は少しばかり高い（20 nmole スケールで、チューブ納品 ¥75 / mer, プレートオリゴ ¥20 / mer）。

2. IDT DNA

<http://ruo.mbl.co.jp/custom/oligo.html>

世界最大の DNA 受託合成会社。シンガポール製造品を日本からも注文できる。DNA オリガミ用のプレートオリゴ（最大 200 mer）注文可。値段が非常に安く（25 nmole スケールで、チューブ納品 ¥27 / mer, プレートオリゴ ¥18 / mer）、指定できる化学修飾の種類も豊富。しかしながら、通関の関係で名古屋にある国内代理店を必ず経由しなければならないため、納期が若干かかるのが玉に瑕。

3. ユーロフィンジェノミクス（旧オペロン）

<http://eurofinngenomics.jp/jp/product/oligo-dna/hts-oligo.aspx>

国内製造の DNA オリガミ用のプレートオリゴ（最大 70 mer）注文可。値段もまずまず（10 nmole スケールで、チューブ納品 ¥50 / mer, プレートオリゴ ¥18 / mer）。

4. つくばオリゴサービス

<http://www.tos-bio.com/index.htm>

アゾベンゼンと CNVK を含んだ DNA の受託合成を取り扱っているほぼ唯一の会社。（50 nmole スケールで、チューブ納品 ¥100 / mer）

5. 北海道システムサイエンス

<http://www.hssnet.co.jp>

6. 日本バイオサービス

<http://www.jbios.co.jp>

この会社は特殊処理（カラム渡しや特殊塩基の使用など）でかなり融通が利く。

■ DNA 注文に必要な情報

各社共通で DNA を注文する際に必要な情報は、下記の通り。

1. 配列名称

ステープル鎖の様に同じ長さの DNA が多数あると、後から化学的に区別するのは非常に困難である。混乱することのないよう、あらかじめわかりやすい名前をつけておこう。

2. 合成スケール

会社によって 10 nmole から 10 μmole まで幅広く指定できるが、BIOMOD のプロジェクト 1 年分ならば、各社で最小の 10 nmole から 25 nmole スケールで十分だろう。

3. 鎖長（塩基数）

会社、合成スケールによって、注文できる最大の

長さが異なるので注意が必要だ。特に DNA オリガミ用のステーブルの注文の際は、注文書類を一通り確認しよう。

4. 配列

特殊塩基を挿入するには会社によって表記の仕方が異なるので、よくホームページで調べておくように。同じ場所に A, T, G, C の四種類をランダムに入れる N という指定の仕方などもある。

5. 化学修飾の有無

5', 3'末端だけでなく、鎖内の修飾もそれぞれ指定できる。DNA の化学合成は 3'末端から行っていくため (☞ 44), 5'末端に修飾するための試薬 (ホスホロアミダイトモノマー) と 3'末端に修飾するための試薬 (CPG カラム) は化学構造も値段も異なる。一般的には、小分けして使いやすい 3'末端修飾用の試薬の方が安い。逆に鎖内修飾用の試薬は非常に高価だ。使用したい場合は、メンターに必ず相談しよう。

6. 精製法

各社ほぼ共通して、脱塩、カートリッジ精製、HPLC 精製、ゲル精製から選択できる。これらは、「いろいろな精製法 (☞ 78)」掲載の、ゲル濾過、DNA 簡易精製カラム、逆相 HPLC、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に相当している。後者になるほど純度の高い DNA が得られるが、納期も価格も跳ね上がるので、実験にどれくらいの純度が必要かよく考えて注文しよう。

7. 代理店情報

請求書を介した大学との実際のお金のやり取りは、研究室出入りの業者が仲介するのが一般的である。これもメンターに適切な業者を指定してもらおう。

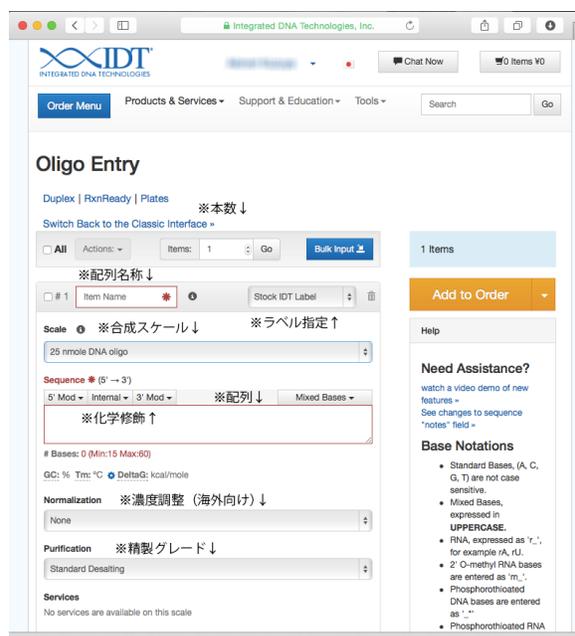
この他にも大学教員名のアカウント情報なども必要になってくる。安くなったとは言え、ステーブル

鎖一式を揃えると十数万円かかるので、最初は念のため、良く事情がわかる人と一緒に注文しよう。

■ 実際の注文画面



シグマアルドリッチ、合成スケール 50 nmole 以上の場合。



IDT DNA でチューブ納品を選択した場合。

参考文献

[1] バイオ実験イラストレイテッド[®], 秀潤社

葛谷明紀 (関西大学)

73. その他の試薬の入手

試薬の入手方およびそのおおよその価格について紹介する。さらに試薬を入手してからの手続きや使用後の廃棄の仕方も法律等で決められており充分熟知しておく必要がある。ここでは試薬の購入から廃棄までの一般的な手順について紹介する。

■ 試薬・その他消耗品の入手方法

試薬はカタログを参照して試薬会社から入手する。購入方法は各大学により異なると考えられるが、北海道大学の場合では、代理店を介して購入する。また、主な試薬会社を表1に示した。

表1. 主な試薬会社一覧

会社名	URL
シグマ アルドリッチ ジャパン	http://www.sigmaaldrich.com/japan.html
ナカライテスク株式会社	http://www.nacalai.co.jp/
和光純薬工業株式会社	http://www.wako-chem.co.jp/
東京化成工業株式会社	http://www.tokyokasei.co.jp/
インビトロジェン	http://www.invitrogen.jp/
フナコシ株式会社	http://www.funakoshi.co.jp/
ロシュ・アブライド・サイエンス	http://www.roche-biochem.jp/
コスモ・バイオ	http://www.cosmobio.co.jp/
関東化学株式会社	http://www.kanto.co.jp/
タカラバイオ株式会社	http://www.takara-bio.co.jp/
TOYOBO	http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/
GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社	http://www.gelifesciences.co.jp/
QIAGEN	http://www.qiagen.com/jp/
キシダ化学	http://www.kishida.co.jp/
MBL 株式会社	http://ruo.mbl.co.jp/?ref=ja_JP
BD Biosciences	http://www.bdbiosciences.com/jp/index.jsp
ニッポンジーン	http://www.nippongene.com/index.html
ユーロフィンジェノミクス	http://eurofinsgenomics.jp/jp/home.aspx
北海道システム・サイエンス株式会社	http://www.hssnet.co.jp/

また、マイクロピペット、スライドガラス、チップなどの消耗品は主に代理店配布のカタログまたはwebサイトにより検索し購入する。

表2. 物品購入時に参照するカタログ

会社名
アズワン
早坂理工株式会社
モノリス
シグマ光機
駿河精機

参考までに、各種試薬・消耗品の価格はおおよそ以下のとおりである。

表3. 主な試薬の値段

品目	容量	価格
塩化ナトリウム	500 g	¥1,500
塩化カリウム	500 g	¥4,000
塩化マグネシウム	500 g	¥3,700
リン酸二水素ナトリウム	500 g	¥4,800
リン酸水素二ナトリウム	500 g	¥3,000
酢酸ナトリウム	500 g	¥1,700
水酸化ナトリウム	500 g	¥1,600
水酸化カリウム	500 g	¥1,470
塩化カルシウム	500 g	¥2,750
Tris	500 g	¥13,000
EDTA	1 g	¥11,000
EGTA	1 g	¥11,000
MES	500 g	¥27,600
PIPES	500 g	¥2,9200
HEPES	100 g	¥6,600
Yeast Extract	500 g	¥1,8200*
Tryptone	500 g	¥1,3400*
Peptone	500 g	¥1,6000*
抗体	100 µL	¥3,0000~70,000
寒天	500 g	¥1,0000
ゼラチン	500 g	¥2,8000
DNA	10nmol	¥50/base**

一例、和光純薬の場合、会社等の違いにより価格は変動する

* BD Biosciences の場合

**ユーロフィンジェノミクスの場合、化学修飾等により値段は変動

表4. 主な消耗品の値段

品目	容量	価格
マイクロピペットチップ (バルクの場合)	0.01 mL (1000 本入り)	¥2,000~4000
	0.2 mL (1000 本入り)	
	1 mL (1000 本入り)	
	5 mL (300 本入り)	¥12,000~
マイクロチューブ	1.5 mL (500 本入り)	¥3,000 前後
	0.5 mL (1000 本入り)	¥5,000 前後
	0.2 mL	¥5,000 前後
スライドガラス	26 x 76 mm, 1 箱 100 枚入り	¥2,000 前後
カバーガラス	18 x 18 mm~ 40 x 50 mm, 1 箱 1000 枚入り	¥3,000~46,000
キムワイブ	200 枚入/箱 x 72 箱	¥13,000
キムタオル	50 枚/1 束 x 24 束	¥10,000
ラテックスグローブ	サイズ L, M, S 100 双入り	¥3,000 前後 (材質による)

※一例、アズワンのカタログの場合、会社等の違いにより価格は変動する

■ 試薬やその他消耗品の登録

試薬またはその他消耗品に関しては、各大学のガイドラインに従い適切に管理する必要がある。ここでは北海道大学の例を紹介する。北海道大学では ID を所持するもののみが使用できるオンラインの試薬登録管理システムを用いている(通称 CRIS)。CRIS に登録した薬品情報は ID を所持するものであれば、誰でも検索することができる。試薬を購入後、添付の安全データシート(SDS※MSDS から名称変更)を基にして、薬品名、重さ、容量、個数、毒劇法等法令分類、保管場所などの情報を CRIS 上に登録する。登録した試薬はラベルを貼り、所定の位置に保管する※。また、試薬の可燃性の有機溶媒など消防法指定数量が管理されている試薬に関しても CRIS で管理される。試薬を使い切った場合には薬品の出庫登録を行う。

※薬品の管理場所に関しては、毒劇物指定のものは、施錠できる薬品棚に入れ管理し、爆発物に関しては、防爆仕様の薬品庫に入れ管理する。

■ 実験廃棄物の安全な管理と処理(北大の場合)¹⁾

[一般的注意]

実験室から出る廃液は、重金属や有機溶剤などの有害物質を含むため法律で規制されている。実験廃液は組成が複雑多岐にわたり、危険な物質を含むことが多いので取り扱いには十分な注意が必要である。廃液を出す人は、廃液の性質、内容について最もよくわかっているため、廃液をセンターに出す前に適切な処置を行い、センターに対し処理に必要な指示をする責任がある。

無機系廃液

種類	注意事項
水銀化合物溶液	金属水銀は収集しないので、貯留容器に入れない。
一般重金属化合物溶液	カドミウム、鉛、クロム、銅、亜鉛、鉄、マンガン、セレン、その他の重金属が対象となる。
写真用定着液	銀を回収するので、現像液やその他の廃液を混ぜない。
シアン化合物溶液	必ずアルカリ性にして貯留する。
ヒ素化合物溶液	酸性のものとアルカリ性のものとの処理方法が異なるので、必ず pH を表示札に記入する。
フッ素化合物溶液	酸性のものは、中和して貯留する。

有機系廃液

種類	注意事項
特殊引火物含有有機溶剤	消防法危険物第4類特殊引火物を含有するもので、他の有機溶剤で希釈して濃度 10% 以下となっているものが対象となる。
ハロゲン系有機溶剤	PCB は収集しないので貯留容器に入れない。
可燃性有機溶剤	PCB 及び爆発性のニトロ化合物、過酸化物は収集しないので貯留容器に入れない。
ホルマリン	感染性のものを除く。
廃油	PCB 含有のものは収集しないので、貯留容器に入れない。
写真用現像液	そのまま貯留する。

引用文献

[1] 安全の手引,北海道大学安全衛生委員会,pp83-85 (~平成 26 年)

佐々木廉, 角五 彰 (北海道大学)

74. ピペット操作

ピペットの先端にプラスチック製の(チップ)を取り付け、機械式のピストン(手動と電動のものがある)で液体を出し入れする。1回の操作で出し入れする体積はダイヤルによって変えることができる。ピペットの代表的なものとしてはギルソン社の「ピペットマン」などがある。

ピペットにはいろいろなメーカーのものがあるが、ここではギルソン社のピペットマンで記述する。先端にプラスチック製の使い捨てチップを付け、ピストンで液体を出し入れするピペットマンは、実験室の主要な計量器である。ピペットマンの吸い取り量は0.5 μL から 10 mL までいろいろなものがあるが、2~20 μL 、20~200 μL 、100~1000 μL の3種類のピペットマンが実験室でよく使用される(図1左)。吸い取り量は調節リングを回し、ダイヤル式の日盛りを動かすことで設定可能である。複数本のチップを同時に装着できるピペットマンもあり、一度に複数の液体を量り取りたいときに便利である。ピペットマンの中のピストンは気密性を保つために内部でOリングによりシリンダーに接している。5 mL 以上の大型のピペットマンでは液体を急に吸った際に液体が飛び上がる事を防ぐために器具の先端に専用の綿栓を装着してある。

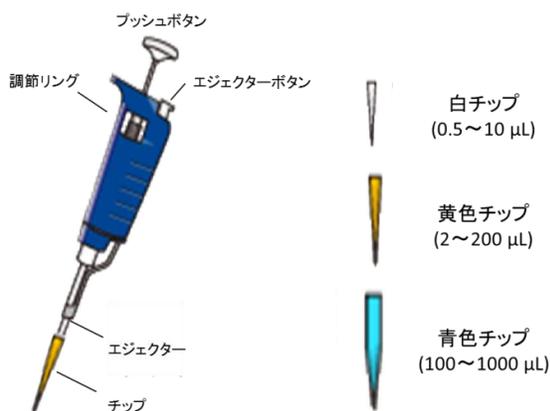


図1: ピペットマンとチップ

■ チップの種類と構造

チップは白(0.5~10 μL)、黄(2~200 μL)、青(100~1000 μL)の3種類がよく使われる(図1右)。大型のピペットマンには白色で大きいチップが使われる。チップはケースに並べて入れ、オートクレーブ(乾燥・滅菌)してから使用する。チップの装着の際はピペットマンの挿入部をチップ上部に確実に押し込んで挿入する。細い所に液を注入するために、チップの先端が平ら、あるいは毛细管になっているものもある。

■ ピペットマンの使用法

吸い取り量が固定式のものには精度が高いものの汎用性がないため、ダイヤル可変式のものの方が一般的に用いられている。まず、ピペットマンの調節リングを回して吸い取り量を設定する。(図2)この際にピペットマンが破損する恐れがあるため、吸い取り量の設定範囲を超えてダイヤルを回さないようにする。

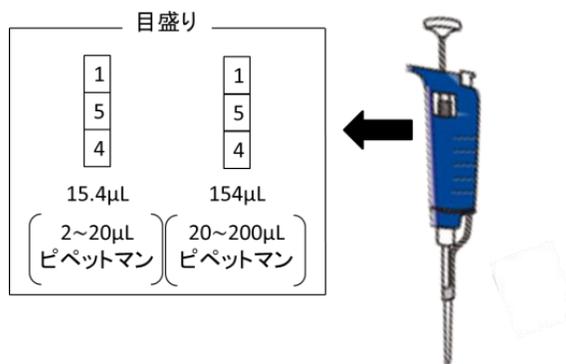


図2: ピペットマンの日盛りの読み方

次にピペットマンにチップを装着し、プッシュボタンを1stストップの位置まで押し、チップの先端が必要以上に液につかない程度に液につける。

この時、自然にチップ内に液が上がるような気密性の悪い器具はそのままでは使用できない。液を吸い取る時はプッシュボタンをゆっくりと戻す。チップ内に空気を吸い込んでいないこと、チップの外側に液がついていないことを確認し、プッシュボタンを押してゆっくりと液を排出する。この際にピペットマンを持つ腕はなるべく動かさず、容器側を移動させるようにする。チップの先端の残液はプッシュボタンを 2nd ストップの位置まで押し込んで排出する。微量の液を排出する際はすべての液が出にくいため、チップの先端で容器の内側を細かくたたくようにして残液を容器の壁に付着させる。容器の壁に付着した液体を底に落とすときは卓上遠心機を用いて遠心する。別の液体を吸い取る際は、エジェクターボタンを押してチップを外し、新しいチップに取り替える(図 3)。

1. エジェクターを押す



2. チップを取り外し可能
(手で取り外すこともできる)

図3: チップのはずし方

■ ピペットマンの不調

ピペットマンの不調には気密漏れと液量のずれがある。前者の場合はピペットマンを分解し、シリンダーにグリースを塗るか、O-リングを交換する。後者の場合はピペットマンで水を吸い取り、天秤で測定する。ピペットマンと天秤の表示の間にずれがある場合は修理に出す。

鈴木隆平, 角五 彰 (北海道大学)

75. 各種溶液・バッファ作製

溶液作製は基本的な実験操作が複数合わさった作業である。用いる試薬によって扱い方が異なるため、本項では試薬のはかりとり方や特殊な試薬の場合の注意点、溶媒の加え方などを解説する。最後に代表的なバッファ(緩衝液)について説明する。

■ 溶液作製時の基本操作

1. 天秤と計量器

- (1) 天秤：粉末試薬の重さを量る(秤量する)際は電子天秤(最低でも千分の一までの目盛りが出るもの)を用いる。秤量にあたっては、天秤の最大・最小秤量などを考慮し、用いる天秤を決める。
- (2) 計量器：液体試薬を測り取る際はメスシリンダーなどの計量器を用いる。ビーカーや三角フラスコの目盛りは正確でなく、10%程度の誤差がある事もある。計量の際は温度に注意する(20℃付近で行う)。

2. 粉末試薬の秤量

- (1) 薬さじを使う時：試薬ボトルの口を天秤皿の近くに寄せ、粉末試薬を薬さじですくって天秤皿上の薬包紙にのせる。微調整は薬さじ上を指で叩くようにして少量ずつのせるか、微量薬さじを使う。
- (2) 薬さじを使わない時：サラサラしている粉末試薬を秤量する場合は、薬さじを使わずに試薬をボトルから直接、薬包紙の上にもせてもよい。微調整はボトルを回しながら試薬をゆっくりと少しずつのせる。

3. 液体試薬の測定

- (1) 機器の使い分け：液体試薬を測り取る際は目安として1 μL ~10 mLまではピペットマンで、0.1~25 mLまではピペットで、数 mL~2 Lはメスシリンダーを用いる。メスシリンダーを用いる際の微調整(メスアップ)はパストゥールピペット、ピペット、ピペットマン、洗浄ビンなどを使って行う(図1)。

- (2) 測定の精度：バイオ実験で使う計量器では、最大容量の0.25%程度の誤差は避けられないと考える。計量器の誤差量は液量にかかわらずほぼ同程度のため、メスアップする量が少ないほど誤差率が高まることになる。そのため10mLの溶液を100 mLのメスシリンダーで測定しない。また、時間がかかる上に人為的ミスによるバラツキも増えるため100 mLの溶液を測り取るのに10 mLのメスシリンダーで10回測るようなことは避ける。

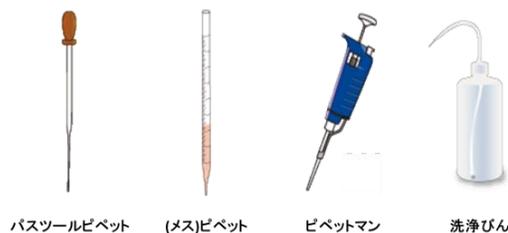


図1: 計量器具

4. 器具に残った溶液の処理

- (1) 共洗い：蒸留水などの洗浄により濡れている容器を用いる際は、溶液の濃度が変わらないようにするためにこれから使用する溶液を少量用いて容器を洗浄する(図2左)。
- (2) 洗い込み：器具内の溶液を別の計量器などに移しメスアップを行う際は、器具内に溶液が残らないようにするため溶液を移した後に器具を少量の蒸留水で洗浄し、この溶液を計量器に移す。この洗浄操作は2~3回行う。洗いこみは溶液を調製する際は必ず行う(図2右)。

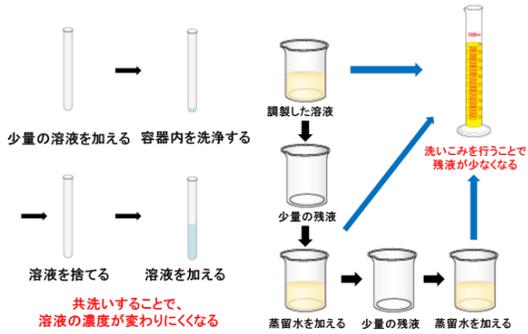


図2: 洗いこみと共洗い

■ 溶液の調製

1. 実験の精度と有効数字

分子生物学実験では作製する試薬の濃度は「有効数字 3 桁」が一般的である。計量は秤量に比べて誤差が大きく 0.3% 程度の誤差は避けられない。

2. 標準的な溶液作製法

(1) 粉末試薬: 粉末試薬を量り取り、ビーカーなどに入れ、蒸留水で溶かす。溶けにくい場合はスターラーチップを用いて攪拌する。粉末が溶けたらメスシリンダーに移し、洗いこみを 2~3 回行う。最後にメスアップを行う。

(2) 液体試薬

液体試薬から容量濃度(% [v/v]) の溶液を作る際は、メスシリンダーで試薬を測り、これをメスアップ用のメスシリンダーに入れる。調製する溶液量が十分に多い場合はメスアップするシリンダーに試薬を直接注いでもよい。重量濃度で溶液をつくる際は試薬を天秤で量り、これをメスアップ用シリンダーに移し、メスアップする。

3. 特殊なプロトコール

(1) 粘度の高い試薬

グリセロールやポリエチレングリコールなどの粘性の高い液体試薬は、洗いこみが困難なためメスシリンダーに直接入れる。調製する溶液の総量に対し、液体試薬の量がわずかな場合は、誤差を減らすために比重から重量を計算し、天秤を使って重さを量る。

(2) 発熱する試薬

塩化マグネシウムや低級アルコールなどの発熱の激しい試薬は、攪拌しながら大量の溶媒に少しずつ入れる。メスアップは温度が室温に戻ってから行う。

(3) 吸湿性試薬

水酸化ナトリウムなどの吸湿性試薬は、試薬ビンから出した後短時間に秤量を終え、速やかに試薬ビンから戻す。試薬の重さを素早く読みとり、溶媒を加えメスアップする。

(4) 試薬ビン内で溶かす

フェノールのような危険性のある試薬、薬さじですくえないほど微量しか入っていない試薬は溶液が安定に保存できるのであれば、試薬ビン内で溶かす。少量の溶媒を何回かに分けて加え、試薬の溶解と洗い込みを行い、メスアップする。

■ バッファー

バッファーは pH の変化を抑えるために用いられる。タンパク質や核酸などはそれぞれ固有の安定な pH、あるいは反応に適した pH がある。生体分子を扱う場合は例外なく 10mM~200mM の範囲でバッファーが用いられる。代表的なバッファーは以下の通りである(図 3)。

生体分子	バッファーの種類(使用pH)
DNA	トリス-塩酸 (pH7.5~8.0)
	酢酸-酢酸ナトリウム (pH8.0)
RNA	酢酸-酢酸カリウム (pH5.2~6.0)
	トリス-塩酸(pH7.2)
タンパク質	トリス塩酸 (pH7.5)
	HEPES-KOH (pH7.0~7.5)
中性の一般的なバッファー	リン酸 (pH6.0~8.0)
電気泳動バッファー(核酸)	トリス-ホウ酸 (pH8.2)
	トリス-酢酸(pH8.0)
電気泳動バッファー(タンパク質)	トリス-塩酸(pH7.5~pH8.5)
	トリス-グリシン (pH8.3)

図3: 代表的なバッファー

参考文献: イラストでみる超基本バイオ実験ノート 羊土社 (2005)

鈴木隆平, 角五 彰 (北海道大学)

76. アニールング

DNA ナノ構造を作製する際に一般的に用いられる手法が、「アニールング」と呼ばれる除冷法である。その概要について解説する。

■ アニールングとは

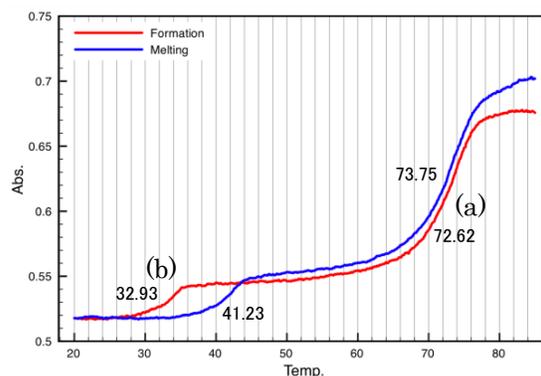
DNA ナノ構造を作製する際に、一般的に用いられる手法が「アニールング」である。アニールングという言葉自体は、一般的には金属を加熱冷却するプロセスについて指す。(これにより、内部のひずみを取り除いたり、展延性を向上させるなどの効果がある。) 構造 DNA ナノテクノロジーの場合は、材料となる DNA が入った水溶液を一旦あたため、除冷することによって、ギブス自由エネルギー最小となる望みの構造を作製するためのプロセスのことをいう。熱湯を用いたり、サーマルサイクラーを用いて行われることが多い。

■ DNA タイルの場合

アニールングの速度、時間などはそれぞれ作製する構造によって異なるので、ここでは例として DNA タイルの場合について述べる。

DNA タイルの場合、一旦 95°C 付近まで溶液を加熱してすべての DNA を一本鎖状態にした後、室温、もしくは 4°C まで 1-2 日間かけて冷却することでアニールングはおこなわれる。DNA タイルの項(☞ 20)で述べたように、DNA タイルは、タイル自体の形成と、sticky end を介したタイル同士の接続という、二段階のプロセスを経て構造が形成される。アニールング時の温度変化に従い、それぞれの構造形成が異なる温度帯で段階を経て行われることで、ワンポットアニールング(すべての材料をひとつの容器に混ぜて、一度の除冷プロセスで一気に構造形成すること)が可能になっている。

具体的には、まず高温域でタイル構造の形成が行われる(a)。そののち、低温域でタイル同士が自己集合する(b)。高品質(もしくは大きな)結晶を得るためには、その両段階、とくに後者のタイル同士の自己集合の段階を極力ゆっくり行うことで、 T_f (形成



T -motif の形成・融解曲線の例 [1]。260nm の吸光度の変化を読み取ることで、溶液中の一本鎖・二本鎖の状態を測定できる。(二本鎖を形成すると吸光度は下がる。)この例の場合、モチーフ(タイル)の形成は 74°C、モチーフ同士が接続される構造形成は 33°C 付近で行われていることがわかる。

温度) 付近の至適温度帯での形成時間をなるべく長くとることが大切である。熱湯を用いたアニールングの場合、発泡スチロールに沸騰したてのお湯をみなみと注ぎ、そこにチューブに入れた DNA 溶液をフロートをもちいて浮かせる。発泡スチロールで蓋をした後、ガムテープ等を用いて密閉し放置する。サーマルサイクラーを用いる場合は、温度下降速度を自由にプログラムできるので、構造形成が行われる温度帯の下降を遅くする。また、その他の温度帯については素早く下げるなど工夫をすることで、全体のアニールング時間の短縮も可能になる。

参考文献

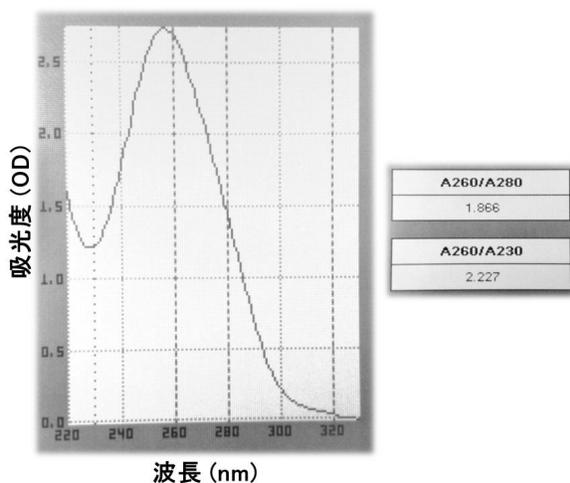
[1] Hamada, S., & Murata, S. (2009). Substrate-Assisted Assembly of Interconnected Single-Duplex DNA Nanostructures. *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 48(37), 6820–6823. doi:10.1002/anie.200902662

77. DNA 濃度/純度測定

DNA は UV 光を吸収し、その吸収スペクトルは 260 nm 付近で極大値をとる。吸光度を測定することで溶液中の DNA 濃度を求めることができる。また、いくつかの波長で吸光度を測定すれば、DNA と異なる吸収スペクトルを持つ物質が混入しているかどうかのわかり、純度を評価することができる。

■ DNA による UV 吸収

不純物のない DNA 溶液に少しずつ波長の異なる紫外 (ultraviolet: UV) 光を当てて、それぞれの光が吸収された割合である「吸光度 (absorbance: Abs)」を測定してその値をプロットすると、下図のように波長 230 nm 付近で極小、**260 nm 付近で極大となる吸収スペクトル**が得られる。これは DNA の塩基がこの波長の光を吸収するためである。厳密には 4 種類の塩基それぞれについて吸収が最大になる波長はわずかに異なり、塩基組成の異なる DNA を比較すると吸収スペクトルの極大波長の位置は少しズレる。吸光度の値から DNA の濃度を求める際、測定装置によっては塩基組成まで考慮して濃度を計算するモードが用意されているものもある。



DNA 溶液の吸収スペクトル測定例。260 nm 付近で吸光度が極大値をとり、230 nm 付近や 320 nm 以上の波長領域では吸光度が低い方が純度が高い。

生物学実験では数キロ塩基といった長い DNA を扱うことが多く、塩基組成が平均化されるのが通常であるため、吸光度の値が 1.0 のときに一本鎖 DNA

ならば 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、二本鎖 DNA ならば 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という固定された換算値がよく用いられる。しかし、オリゴヌクレオチドと呼ぶ方がよさそうな短い DNA どうしを等量ずつ混ぜてハイブリダイゼーションさせるような実験では、塩基組成も考慮して濃度を求める方が良いだろう。

■ DNA の濃度測定

吸光度は「光学密度 (optical density: OD)」とも呼ばれる。各物質はそれぞれ固有の「モル吸光係数 (molar extinction coefficient)」を持ち、物質の濃度と吸光度の関係は以下の式で表される **ランベルト・ベールの法則 (Lambert-Beer law)** にしたがう。

$$\text{Abs} \equiv \log(I_0/I) = \varepsilon dc$$

ここで、 I_0 は入射光の強度、 I は透過光の強度、 ε はモル吸光係数 [$\ell/(\text{mol} \cdot \text{cm})$]、 c は濃度 [mol/ℓ]、 d は光路長 [cm] である。

DNA の濃度測定には高濃度の溶液を使用する必要がある。従来は、光路長 1 cm のセルを使用するタイプの分光光度計が主流であったが、菌体を培養して大量のゲノム DNA などを回収する生物学実験とは異なり、DNA ナノテクノロジー分野の実験では化学合成した DNA を用いることが多い。そのため、より微量な溶液で測定できるマイクロセルを使用するタイプや、セルを使わずに数 μl のサンプル溶液を機器に直接のせるだけで測定ができ、測定後もキムワイプで拭うだけというタイプが普及してきている (☞ 82)。

■ DNA 濃度測定の注意点

生体分子実験に用いられるバッファーには、230 nm

付近で高い吸光度を示すものがある。DNA をバッファーに溶かしたときは、濃度を測定する際のブランク溶液にも必ず同じバッファーを使用しよう。また、正確に吸光度が測定できるのは、測定装置によっても値は異なるが、たとえば 0.1~1.0 の間といったように比較的狭い範囲である。自分が使用する装置に適切な値となるように、濃度をあらかじめ大まかに調整しておく必要がある。

先ほど述べた吸光度と DNA の換算値では、二本鎖 DNA の値 (33 $\mu\text{g}/\text{ml}$) は一本鎖 DNA の値 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 2 倍したものよりも小さくなっている。これは、ランダムコイル様の一本鎖 DNA と、塩基が二重らせん構造内で整然と並んだ二本鎖 DNA で、UV 光に対する吸収特性が異なるためである。同量の分子でも状態の変化にともなってモル吸光係数が減少する現象は「**淡色効果 (hypochromicity)**」と呼ばれる。淡色効果による吸光度の変化を観測することで、二本鎖 DNA の融解温度を求めることができる (☞ 82)。

■ DNA の純度測定

タンパクの吸収スペクトルは DNA と異なり、280 nm 付近で極大となる。また、フェノールなどの有機溶媒やペプチドは 230 nm 付近の光をよく吸収する。合成会社に合成・精製してもらった DNA の測定では先の図のような吸収スペクトルが得られるが、生体試料から DNA を抽出したときなどは、タンパクや抽出操作に使用した有機溶媒が残存していると、それらの吸収スペクトルを重ね合わせたものになる。そこで DNA の純度を評価するために、波長 260 nm の吸光度値 Abs_{260} のほかに 230 nm や 280 nm の吸光度値も測定してその比を求めると良い。目安としては $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ の値が 1.8~2.0、 $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$ の値が 2.0 以上であれば純度が高いと言える。また、320 nm もしくは 350 nm における吸光度値がほぼゼロであるかどうか、正しく測定できているか、夾雑物がないかの目安として確認することをお薦めする。

■ DNA 濃度測定の必要性と限界

DNA の自動合成法が確立されて以降、100 塩基長程度までの DNA 合成の価格は大きく下がり、研究者自身で行うよりも外注の方が一般的になっている。設計した塩基配列を web 上で入力すれば数日のうちに DNA が届き、価格も数千円~数万円で済む (☞ 72)。DNA 合成会社から送られてくるデータシートやラベルには DNA 量が記載されているが、分光光度計を使用して自分で測定するのが望ましい。

DNA ナノ構造体の作成であれば、各配列の存在量のバラつきはそれほど問題にならないが、DNA 論理ゲートなどでは相補配列どうしが複合体を形成することで、多段階の反応が勝手に進行してしまわないようにデザインされているため (☞ 29)、各配列を正確な量比で混合するために、濃度を厳密に調整する必要がある。実際に測定してみると数割程度ズレた値であることもよくある。その原因を特定することは難しいが、自分の発注している会社が塩基組成も考慮したモル吸光係数を使用しているかどうかや、発送までの各時点でどのように濃度を測定しているのかなどを確認してみると良いだろう。

それでも、濃度測定した値をもとに DNA の量を寸分の狂いもなく量り取り、正確な量比で混合して反応を行うことは難しい。そもそも反応溶液を調整する際に使用するマイクロピペッターの秤量には誤差があるし、同じ人が同じ手順で行った測定でも数値にはバラつきが出る。自分が使用している器具や機器で正確に測定できる範囲や条件を把握した上で、繰り返し実験を行って再現性を確認し、その範囲内で動作や効果を実証する結果が得られるように実験計画を立てることも大切である。

参考文献

[1] M. Green, J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th Edition," Cold Spring Harbor Laboratory Press.

小宮 健 (東京工業大学)

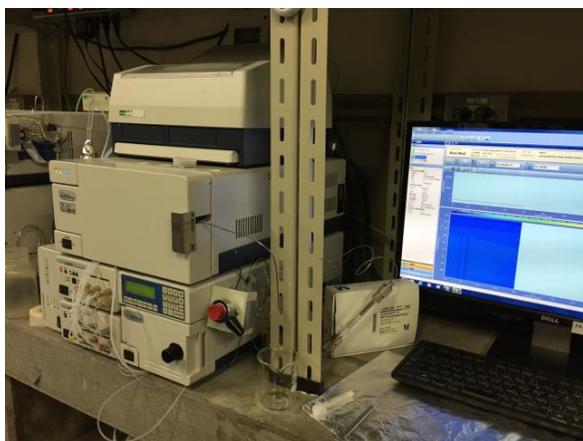
78. いろいろな精製法

机上の反応式とは異なり、実際の実験で使った反応液には、未反応の出発物や副産物、また過剰の緩衝剤や塩など、様々な物質が溶けている。そこで、なんらかの反応を行った後には、これらの夾雑物を取り除き、目的物だけを純度良く回収する「精製」が欠かせない。DNA 精製によく使われる手法を紹介しよう。

DNA を精製する手法は、大きく 1. DNA の化学的性質（親疎水性）を利用する、2. DNA の分子サイズを利用する、の二種類に分類される。

■ 逆相クロマトグラフィー

DNA の化学的性質を利用して分離する手法の代表選手は、逆相カラムを利用した高速液体クロマトグラフィー（HPLC）だ。オクタデシル基（C18）で修飾したシリカゲル（ODS）を担体としたカラムを使用することが多い。C18 との相互作用の大小でサンプルが分離されるために、疎水性の強い分子ほど、カラムに保持されて、溶出時間が長くなる。親水的なものほど強く吸着するシリカゲル（順相）と反対の性質なので「逆相」というわけだ。DNA とそれ以外の分子を分けるためには最強の手法と言えるが、反面、DNA の一塩基の長さの違いなどを見分けるのは苦手だ。ゲル電気泳動と組み合わせて使用しよう。



HPLC システムの例。キーボードと LCD の左側に見えるのが、逆相 HPLC カラム。

逆相カラムを利用した DNA 専用の簡易精製カラムも市販されている。これらの特長は、塩基性で溶

けてしまうシリカゲルベースの担体では無く、酸にも塩基耐性のあるポリマーベースの担体を使用していることだ。これにより、DNA 化学合成（☞ 45）の最終段階にあたる濃アンモニア水による脱保護・切り出しを行った溶液をそのままカラムに流すことができ、末端の DMTr 基の疎水性を利用して、目的物のみをトラップする。洗浄操作ののちに、今度は酸性の溶液を通すと、DNA 末端の DMTr 基が外れ、完全に脱保護された DNA だけが回収できるようになる。



DNA 簡易精製カラム（グレンリサーチ社ポリパック）。上のように、シリンジにとりつけて使用する。

■ ゲル電気泳動法

DNA を分子サイズで分ける手法の代表が、ゲル電気泳動法である。使うゲルの違いで、アガロースゲル電気泳動とポリアクリルアミドゲル電気泳動の 2 種がある。それぞれゲルネットワークの編み目の大きさが違うので、100 塩基以上の長鎖の DNA や DNA オリガミはアガロース、短鎖の一本鎖 DNA はポリアクリルアミドで分けると良い。詳しくは次項にて（☞ 79）。

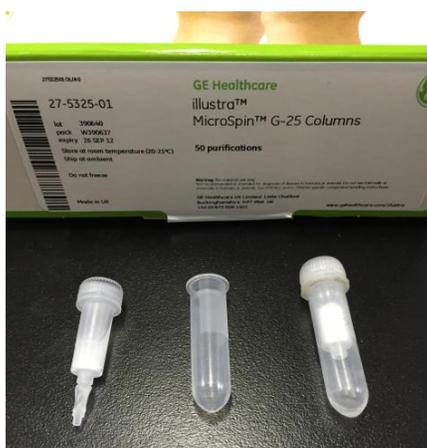
■ ゲル濾過

DNA 溶液を脱塩する目的では、ゲル濾過カラムが便利だ。この方法は別名サイズ排除クロマトグラフィーとも呼ばれ、ゲル担体が充填されたカラムに目的の溶液を通すと、イオンや小分子などはゲルの編み目にトラップされながらゆっくり流れてくるのに対し、DNA などの大きな分子は編み目にトラップされずにそのまま流れてくる、という原理を利用している。

ゲル担体の代表選手は Sephadex G-25 (GE ヘルスケア社#17-0032 など) で、分子量 2500 以下の夾雑物をトラップしてくれる (すなわち、10 塩基より短い DNA は使えない)。写真のような、自然落下型の Nap-5/10 カラムや遠心チューブ型の MicroSpin など (いずれも GE ヘルスケア社)、さまざまなプレパックカラムが販売されている。



Nap-5 カラム (上) と Nap-10 カラム (下)



MicroSpin G-25 カラム. 右のようにセットして遠心すると、遠心力で液がカラムを通過する。

■ 限外濾過

ナノメートルサイズの微細な穴の開いたメンブレンフィルターを用いて行う濾過が、限外濾過だ。フィルターは、分画分子量 (これ以上の分子量の物質を通さない) が 3000 から、10 万まで様々なものが市販されている。有名どころは、アミコンウルトラシリーズ (ミリポア社#UFC500308 など) 当然、自然落下では溶液はフィルターを通過しないので、遠心力を利用して、強制的に溶液を通す「スピンカラム」として利用することが多い。



アミコンウルトラ

■ フェノール抽出, エタノール沈殿, 密度勾配遠心[1]

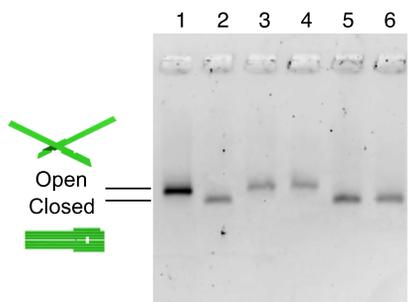
酵素反応を行った後に、DNA 溶液から酵素などのタンパク質を取り除きたいときには、古くから使われているフェノール抽出法も有効だ。その後の脱塩は、やはり歴史のあるエタノール沈殿でもかまわないが、回収率に難点があるため、上述の脱塩法のいずれかを使うと良いだろう。スクロースなどで溶液に密度勾配をつくり、分子の比重で分離する密度勾配遠心も DNA やナノ構造体の分離に有用だ。

参考文献

[1] バイオ実験イラストレイテッド①, 秀潤社

コラム DNA オリガミの精製

非常に大きな分子量を持つ DNA オリガミ構造体であるが、アニーリングでの形成率がいまひとつの場合は目的物のみを単離したり、過剰のステープル鎖を取り除きたくともあるだろう。その場合に最も汎用的な手法は、アガロースゲル電気泳動である。1×TAE/Mg²⁺緩衝液を泳動用の緩衝液として使うため、泳動層全体の温度コントロール（放っておくとかなり発熱する）が大変だが、うまく組めた DNA オリガミは染色すると非常にきれいなバンドになる。バンドをカミソリなどでゲルごと切り出して、Freeze 'N Squeeze DNA ゲル抽出カラム（Bio-Rad 社#732-6165）などを使えば、DNA オリガミをきれいに回収できる。



DNA ペンチの 1.5%アガロースゲル電気泳動* ステープル鎖を除くだけならば、限外濾過が簡便で良い。分画分子量 10 万のアミコンウルトラ 0.5（ミリポア社#UFC510096）を使用して遠心し、1×TAE/Mg²⁺緩衝液 100 μL を加えて遠心する操作を 3 回ほど繰り返せば、ステープル鎖はきれいに取り除ける。Microspin S-400 HR を用いたゲル濾過も同様の効果が期待できるが、回収率が低いのが難点である。

その他、ストレプトアビジンコート磁気ビーズを使った目的分子のつり上げや、密度勾配遠心なども利用できる。

*T. Yamazaki, Y. Aiba, K. Yasuda, Y. Sakai, Y. Yamanaka, A. Kuzuya, Y. Ohya, M. Komiya, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 11361–11363.

葛谷明紀（関西大学）

79. 電気泳動法

電気泳動は、荷電した分子や粒子が電場の中を移動する現象である。その現象を利用した解析手法が、電気泳動法であり、特に分子生物学や生化学ではDNAやタンパク質を分離する手法として必要不可欠なものである。ここでは、について説明しよう。

■ 電気泳動

ロシアの物理学者フェルディナンド・フリードリヒ・ロイスが水中の粘土粒子で発見したのに始まる。電気泳動とは、溶液中の荷電物質が電場のもとで移動する現象を言い、荷電物質とはペプチド・タンパク質・核酸（DNA・RNA）など、水溶液中で正（+）又は負（-）の荷電を持つ物質のことである。水溶液中では試料が拡散してしまうため、支持体として膜やゲルを用い、膜やゲル中を荷電物質が移動していく。膜やゲル中の物質は、直流電場下で、形・荷電状態・分子量等に応じて自分の電荷と反対の電極へ向かって移動する。その際の移動速度が物質によって異なるために各々が分離される。また、支持体にはアガロースゲルやポリアクリルアミドゲルが用いられるが、これらのゲルは網目状の立体構造をもつので、物質に対しふるいの役割をはたす。小さな物質は速く、大きな物質は遅く移動し、分子量に応じた分離が可能であり、適切な分子量マーカーを用いることで、電気泳動によって分子量の決定も可能である。ふるいをかけずに荷電状態や形状に応じた分離方法もあり、いろいろと組み合わせてることで試料中の各成分を分離することが出来る。

電気泳動は、この様な分離原理を利用して分子量決定をはじめ等電点や純度決定、各成分の定量・精製等に利用され、タンパク質・DNA・RNAの分離・分析法である。

■ アガロースゲル電気泳動[1]

一般的な電気泳動に、タンパク質や核酸を分離するために使用するポリアクリルアミドゲル電気泳動とアガロースゲル電気泳動がある。ポリアクリルアミドゲルとアガロースゲルの使い分けは網目の孔（穴）

の大きさで、ポリアクリルアミドゲルは低分子量、アガロースゲルは高分子量用と考えて良い。たとえば、DNAで1~700 bpの大きさにはポリアクリルアミドゲルを使用し、約500 bp以上の大きさにはアガロースゲルを使用する。また、タンパク質では、数百Da~数十kDa程度ならアクリルアミドゲルで十分だが、タンパク質の複合体などで、数百kDaを超えるならアガロースゲルを使用すると良い。

DNAを例にしながら、アガロースゲルの方法を紹介する。分離したいDNAのサイズに合わせて、ゲルのアガロース濃度を調整する。目安を下に示す。

- 0.6% 1-20kb (BPB: 約1.5kb)
- 0.75% 0.8-10kb (BPB: 約1kb)
- 1% 0.5-7kb (BPB: 約0.5kb)
- 1.5% 0.2-3kb (BPB: 約0.3kb)

以上から例えば、プラスミドDNAならおよそ0.75%か1%で電気泳動を行えばよい。さらに泳動中は試料と混合するローディングバッファに含まれるBPB（プロモフェノールブルー）が流れるバンドを目安にしながら電気泳動を行えばよい。

■ ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) [2]

ポリアクリルアミドゲルはモノマーのアクリルアミドとN,N'-メチレンビスアクリルアミド (Bis) の重合体で、ゲル作製（重合）時に一緒に加える過硫酸アンモニウム (APS) は重合開始剤、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) は重合促進剤である。モノマーのアクリルアミドは神経毒なので取り扱いには十分注意する必要がある。アガロースゲル同様に分離したい試料の分子量に合わせて、重合度を調整する。

DNAやRNAのPAGEでは、核酸分子に尿素などの

変性剤を加えることで、直線状の1本鎖としてから泳動を行うことで、長さに応じて精密に分離することが出来る。変性剤を加えなければ、DNAやRNAがNativeに取る構造を保持した状態で泳動することが出来るので、DNAやRNAでデザインした構造体を形成しているか確認することが可能である。

タンパク質では、陰イオン系界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を加えて変性させ泳動する。この方法がSDS-PAGEで、核酸の場合と同様に分子量による分離が行える。さらに、正確に分子量で分離するために、タンパク質試料に還元剤である2-メルカプトエタノールを加えて煮沸し、S-S結合(ジスルフィド結合)を切断してから電気泳動を行う。また、核酸の場合と同様に、未変性のまま泳動するNative-PAGEがあり、タンパク質の等電点、分子量、高次構造や複合体形成の影響で泳動が変化する。目的のタンパク質のバンドがどこに出るか予測するのは難しく、塩基性のタンパク質は陰極側に泳動してしまうので注意が必要である。さらには、タンパク質の等電点を利用して、分離する等電点電気泳動を1次元目に、SDS-PAGEを2次元目に利用することで、血清中などの多種のタンパク質から目的の試料を探し出す、二次元電気泳動などもある。

■ まとめ

以上、電気泳動法を紹介したが、実際に実験を行う際には、参考文献として記載した書籍などを利用して行うことをお勧めする。

参考文献

- [1] 中山広樹, 西方敬人, バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎, 秀潤社
- [2] 大藤道衛, 電気泳動なるほど Q&A, 羊土社

80. 電気泳動の評価

電気泳動により分子をゲル中で分離しただけでは、結果を観察することはできない。インターカレータで染色した DNA や蛍光修飾した DNA を観察することで、ゲル中の位置を特定し、構造の確認や、反応効率・速度などの情報を得ることができる。ゲルの染色・観察・定量方法について簡単に解説する。

■ 染色剤の調製

電気泳動(☞ 79)を行ったゲル中のどの位置に DNA 分子が存在するか調べる方法として、一般的に染色が行われる[1,2]。DNA の染色には、DNA 特異的に結合し、結合した場合にのみ蛍光が強くなる分子を用いる。蛍光を示すのは塩基の間に挟まる(インターカレートする)ためである。

DNA の染色には臭化エチジウム(EtBr)が頻繁に用いられてきたが、現在では様々な商品が発売されているため、目的に応じた染色剤を用いる。染色する目的は様々な観点から分類できる。例えば、励起・蛍光波長が挙げられる。Gel Green と Gel Red と呼ばれる染色剤は、名前の通り蛍光波長が異なる。

別な観点として、二本鎖だけを染色するか、一本鎖も染色するかの違いがある。SYBR Green I と呼ばれる染色剤は二本鎖の検出に用いられるが、SYBR Gold は一本鎖、二本鎖の両方に使うことができる。東北大学では、特に条件がない場合、SYBR GOLD で染色を行っている。

これらの染色剤は購入した時点では 10000× の高濃度になっている。まずは小さいタッパーなどに、**以下のような組成で希釈する。**

1×SYBR GOLD

10000× SYBR GOLD : 10 μ L

超純水(mQ) : 100mL

臭化エチジウムを始めとする染色剤は、発癌性のある危険物と考えられており、手袋をするなど扱いには十分に気を付ける。

■ 染色および観察

完成した染色液に、泳動後のゲルを浸し DNA を染

色する。染色時間や方法には様々な流儀があると思われるが、東北大学では **20 分程度振とう**している。アガロースゲル電気泳動では、ゲルの作製時に染色剤を混ぜておく「先染め」という手法があり、その場合は追加の染色操作は不要である。

染色したゲルは UV トランスイルミネータや専用の装置で観察する。例えば、図 1 の強度を変更できる UV トランスイルミネータや BIO-RAD 社の ChemiDoc などがある。ゲルを壊さないように注意して、装置内に染色後のゲルを置く。

どちらの装置でもカメラにより蛍光を撮影し、DNA の位置を特定する。UV トランスイルミネータでは装置の下から UV を照射し、染色剤を励起して、その蛍光を撮影する。ChemiDoc では UV の他に青色と緑色の LED がついており、励起光・蛍光の波長に合わせて設定を変更できる。

観察の際には露光時間が重要なパラメータとなる。露光時間を上げることで感度良くデータを得られるが、その分バックグラウンドが大きくなる。また感度を上げすぎると、撮影した蛍光がサチってしまい、定量性が失われてしまうので注意する。

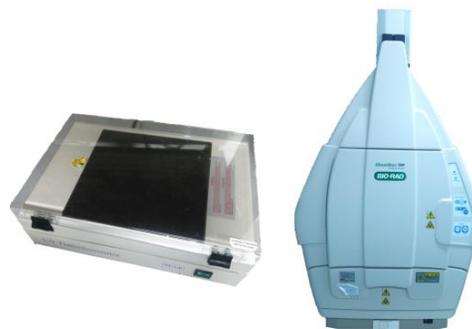


図 1 トランスイルミネータと ChemiDoc
(東北大学で使用している装置)

■ 蛍光を直接観察

染色剤による DNA の標識方法について解説したが、実験によっては特定の分子の位置だけを調べたい場合がある。その場合は染色を行わず、その特定の分子をあらかじめ蛍光標識(修飾)しておく手法を用いる。UV で励起される蛍光を選ぶと、染色を行わずに UV トランスイルミネータで、その分子の存在位置を特定することができる。この手法では、蛍光を観察した後にさらに染色を行い二回目の観察を行うことで、通常の電気泳動よりも多くの情報が得られる利点がある。

■ 実験上の注意点

UV トランスイルミネータでゲルを観察する際には、ゲルの向きに注意する。複数の UV 管が入っていると、UV 管によって励起光の強さにムラができる。UV 管をまたぐと、定量的な評価を行うことができない場合がある。

電気泳動の目的が精製(☞ 78)であれば、目的の産物を切り出して、精製のプロセスに進む。観察を終えたゲルはラップに包み、所属機関の定める方法で処分する。ゲルをのせてあったトランスイルミネータなどの装置は、次回以降の観察でノイズが写らないように、アルコールとキムワイプできれいに拭く。

染色液は 3 回程度使用すると染色能力が低下するので、その都度新しいものを準備する。廃液となった染色液はそのまま流しに排水してはいけない。こちらも所属機関の定める方法で処分する。例えばだが、一定期間タンクに蓄積し、最終的にエチプロデスタロイヤーという商品で分解・処分する方法がある。

■ ゲルの観察結果の定量化

ゲルを観察して得られた画像には、DNA が存在する位置を示すバンドが見られる。そのバンドの情報から実験結果の評価を行う。単純な評価方法の一つは、バンド位置の変化を見ることである。泳動度は分子の大きさや電荷によって変わるので、ある位置にあったバンドが、別な条件で異なる位置に移動している場合は、構造に変化があったと言える。例えば図 2

上部の BIOMOD2014 仙台チームの電気泳動結果[3]で、一番左と一番右のレーンを比べると、TransducerA の位置のバンドが OutputA という位置に移動している。下の表に書かれている通り、異なるレーンは異なる反応時間に対応するので、蛍光標識した DNA が時間の経過により構造変化したことが分かる。

バンドの蛍光強度から定量的な情報を得ることができる。具体的には反応前と反応後のバンドの輝度を比較し、何%反応したか評価可能である。ただし染色剤を使った場合、バンドの蛍光量は主にヌクレオチドの量に比例することに注意する。

蛍光標識した場合は、輝度がそのまま分子の濃度に比例すると考えて良い。先ほどの TransducerA と OutputA の総和に対する OutputA の比を求め、反応割合をグラフ化したものが図 2 下部である。B,C についても同様である。時間の変化に伴い、OutputC, A, B の順に濃度が増加していることが分かる

このように電気泳動の結果から、構造物の確認だけでなく、反応速度や効率を定量することができる。

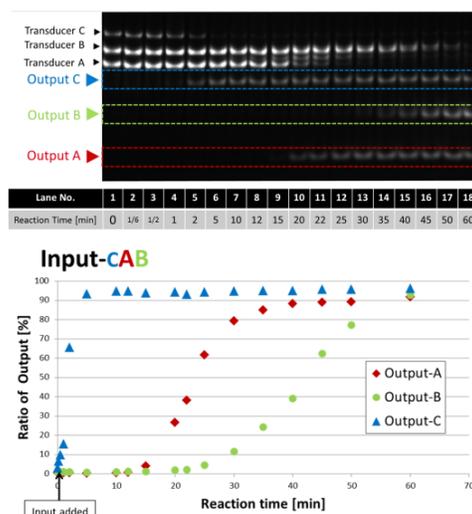


図 2 ゲル画像と定量化[3]

参考文献

- [1] 平尾一郎, 胡桃坂仁志: “拡散実験の原理とプロトコール”, 羊土社
- [2] 中山広樹, 西方敬人: “バイオ実験イラストレイテッド ②遺伝子解析の基礎”, 秀潤社
- [3] <http://teamsendai2014.github.io/index.html>

川又生吹 (東北大学)

81. 蛍光分光光度計

物質が光を受け、受けた光より長い波長（低いエネルギー）の光を放出する現象のことを蛍光という。蛍光分光光度計は、遺伝子発現、生体分子間の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）などに最適な装置である。ここでは、蛍光の原理と FRET について説明する。

■ 発光とは？[1]

物質には、エネルギーを吸収するとそのエネルギーを光で放出（発光）する、これをルミネッセンスと言う。ルミネッセンスは様々な種類があり、蛍光は、光（紫外・可視光）のエネルギーを吸収し発光するフォトルミネッセンスの一種である。光は $E = hv$ (E :エネルギー、 h :プランク定数、 v :振動数) で表される。光が物質にあたる時、光の持つエネルギーが物質に吸収される。エネルギーの吸収により、安定なエネルギー状態（基底状態）にあった物質は、一時的に高いエネルギー状態（励起状態）になる。この時、物質は安定な基底状態に戻ろうとしてエネルギーを放出する。差分のエネルギーを熱ではなく、光として放出する現象を発光という（図 1）。

■ 蛍光とりん光

光刺激による発光には、蛍光とりん光がある。蛍光では、吸収したエネルギーの一部は熱として放出し、残りのエネルギーを光として放出する。りん光の場合も同様に熱を放出する。この際、項間交差が起こり、すぐに基底状態に戻れず、ゆっくりと発光し続ける現象がりん光である。蛍光はナノ秒オーダー、りん光はマイクロ・ミリ秒オーダーで発光する。

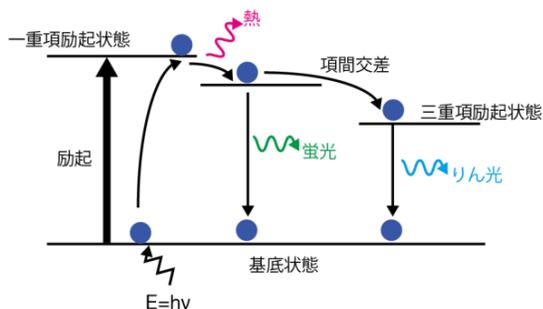


図 1. 発光のメカニズム

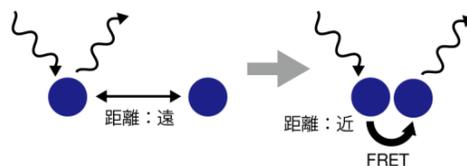


図 2. FRET

■ 励起スペクトルと蛍光スペクトルの測定

励起スペクトルは検出する蛍光波長を固定し、励起光の波長を走査して蛍光強度を測定する。最も強い蛍光強度を与える波長が、最適励起波長である。励起スペクトルは、試料の吸収スペクトルと一致し、吸収極大波長で最も強い蛍光を生じる。

蛍光スペクトルは、励起光の波長を固定して、蛍光強度を測定する。励起波長の違いによって、蛍光スペクトルの形状が変化することがないため、固定する励起波長は、最も強い蛍光を生じる最適励起波長を使用する。蛍光スペクトルのピークは吸収スペクトルのピークよりも長波長側にあらわれる。

■ FRET

蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence resonance energy transfer : FRET）とは、近接した 2 個の色素分子の間で励起エネルギーが、直接移動する現象である。このため、一方の分子（供与体）で吸収された光のエネルギーによって他方の分子（受容体）にエネルギーが移動し、受容体が蛍光分子の場合は受容体から蛍光が放射される。FRET の観察手段の 1 つとして、供与体の吸収スペクトルに相当する光で供与体を励起し、受容体から放射される蛍光強度の増加を検出する方法がある。

参考文献

[1] 日本分光 HP より

森田雅宗, 瀧ノ上正浩 (東京工業大学)

82. UV 分光光度計

DNA が二重らせんを形成する過程を分子のスケールで直接観察することは難しい。DNA が二重らせんを形成したかどうかは、紫外線の吸収を測定することによって間接的に観察する。UV 分光光度計を使った融解曲線の測定と、融解温度の求め方、実験上の注意点などについて解説する。

■ 260nm の紫外線を吸収する DNA

DNA が水素結合により二重らせんを形成する過程 (ハイブリダイゼーション(☞ 41)は、DNA ナノテクノロジー(☞ 17)の根幹をなすものであり、その性質を理解することは新しい構造やシステムを作る上で必要不可欠である。しかしながら DNA はナノスケールの分子であり、光学顕微鏡によって直接ハイブリダイゼーションを観察することはできない。

そこで紫外光の吸収を測定し、間接的に DNA の存在を調べる方法を用いる。DNA の濃度や純度の測定に用いられる手法と基本は同じである(☞ 77)。

DNA は 260nm の波長の光を吸収するが、一本鎖と二本鎖でその程度に変化がある(淡色効果)。温度を変化させた時の吸光度の変化を測定することで、融解温度(T_m)を求めることができる。安定に二重らせんを形成する温度や、一本鎖に解離する温度の指標にする。

■ セルとサンプルの準備

石英など紫外線を透過するセル(キュベット)の中にサンプルを入れて吸光度を測定する。加熱と冷却を行えるセルであることに注意する。マイクロセル、8 連マイクロセルや、キャピラリーセルなどの様々な種類があり、用途に合わせて選ぶ。

セルの選択においては、光路長、サンプル濃度と量のバランスが重要である。光路長は通常 10mm であるが、キャピラリーセルでは 0.5mm である。光路長が長いと必要なサンプル量が多くなる代わりに、SN 比が良い。逆に光路長が短いと、SN 比が悪い代わりに、少量のサンプルで測定が可能である。例えば、小さい濃度で測定する場合は長い光路長、大きい濃度で測定する場合は短い光路長のセルを選ぶ。

東北大学では使い捨てのキャピラリーセルで、次

に示す組成でサンプルを調製し、測定を行う。

25 μ M DNA サンプル

DNA1 (100 μ M) : 5 μ L

DNA2 (100 μ M) : 5 μ L

10×バッファー : 2 μ L

超純水(mQ) : 8 μ L

DNA1 と DNA2 はハイブリダイゼーションさせる互いに相補な DNA である。キャピラリーセルの場合は 10 μ L もあれば十分であるが、30 塩基程度の短い DNA だと 25 μ M と高濃度の DNA が必要である。

低い濃度で測定する場合は、別なセルを使用する。使い捨てでないセルは、超純水で良く洗浄し、側面および内部をエアダスターで乾かす。濃度が変わらないように、余分な水滴を残さないように注意する。

■ ブランクの測定

DNA の入ったサンプルを測定する前に、ブランクとして 1×バッファーだけを測定する。試料にキャピラリーの先端を漬けると、毛細管現象によりセルの



図 1 キャピラリーセルと UV 分光装置
(東北大学で使用している装置)

内部が液体で満たされる。専用のアダプターに入れ、測定装置にセットし吸光度を測定する。キャピラリーセルと分光光度計の装置の一例を図 1 に示す。光路が汚れると正しく測定できないので、光路上のガラスや石英に触れないように注意する。

装置の種類によっては光源強度の変化を補正するためにダブルビーム方式を採用している。長時間にわたって測定し、データを比較する場合は、リファレンス側にバッファーを入れたセルをセットする。

■ サンプルの測定

ブランクの測定が終わると、いよいよサンプルの測定を行う。同様にサンプルを入れたセルを装置にセットする。温度を上げた状態から徐々に温度を下げる。例えば 90℃から始めて 20℃まで、1 分あたり 0.7℃下げるプロファイルで実験する。T_m が予想できている場合は開始と終了の温度を変えても良い。

例として ATTGGATACAAA とその相補鎖の T_m を求める。測定が終了すると、図 2 上部のような横軸が温度、縦軸が 260nm の吸光度である融解曲線が得られる。結合時と解離時で融解温度が異なるサンプルについては、逆に温度が低い状態から温度を上げ、融解曲線を 2 回測定することもある。厳密な定義に従えば、融解温度は二本鎖が解離するときの温度なので、後者の曲線から求めた融解温度が正しい T_m となる。一方前者から求めた値は形成温度 T_f と呼ぶ。

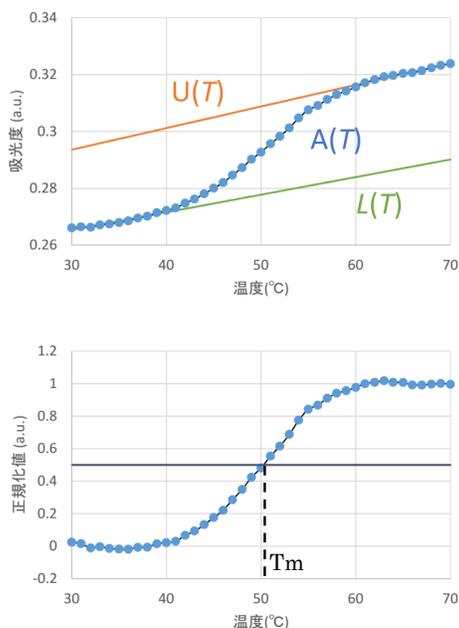


図 2 融解曲線 (正規化前と後)

■ 融解温度と融解曲線の正規化

得られた融解曲線から融解温度を求める。単純な方法としては、吸光度の最も大きい値と小さい値の平均値を算出し、その値になる温度を T_m とする。

より正確な方法として、データを 0 と 1 の間で正規化し、さらに温度が低い領域と温度が高い領域が直線になるように補正を行う[1]。図のように温度 T を変数として、データを $A(T)$ 、近似した直線を $U(T)$ と $L(T)$ とすると、補正式は以下ようになる。

$$\frac{A(T) - L(T)}{U(T) - L(T)}$$

補正を行ったグラフが図 2 の下側である。一本鎖と二本鎖が半々である 0.5 となる温度を読み取り、T_m とする。図の場合はおよそ 50.5℃である。Nearest-Neighbor モデルに基づいて求まる理論値 53.6℃に近い(☞ 41)。

■ 紫外分光以外の方法

一本鎖と二本鎖の区別には、260nm の紫外光の吸収が淡色効果により変化することを用いてきた。別な方法として、SYBR Green と呼ばれる二本鎖にインターカレートして蛍光を示す染色剤(☞ 81)を用いる手法がある。蛍光の観察により一本鎖と二本鎖の区別ができ、やはり融解曲線を得ることができる。

いずれの方法でもあらゆる二重らせんの解離を測定してしまい、特定の位置にある特定の DNA の解離を定量することは不可能である。そこで用いられるのが、FRET である(☞51)。特定の DNA に蛍光分子を修飾し、構造が形成した状態で空間的に近い位置にある DNA に消光分子を修飾する。例えば DNA オリガミ(☞18,19)において、場所によってどれくらい解離しやすいかを定量することができる[2]。

参考文献

- [1] 小宮健, 瀧ノ上正浩, 田中文昭, 浜田省吾, 村田智: "DNA ノエンジニアリング", 近代科学社
- [2] Xixi Wei, Jeanette Nangreave, Shuoxing Jiang, Hao Yan, Yan Liu: "Mapping the Thermal Behavior of DNA Origami Nanostructures", Journal of the American Chemical Society, 135, 6165-6176, 2013

83. 光学顕微鏡

肉眼で見える最小の大きさは髪の毛の太さ(およそ 0.1 mm)程度である。これ以下のものを見るために開発されたものが顕微鏡である。光学顕微鏡は可視光線を利用した顕微鏡であり、レンズにより物体を数十倍から1500倍に拡大し、およそ 0.2 μm くらいの大きさまでの物体を観察することができる。現在では位相差顕微鏡や蛍光顕微鏡、全反射顕微鏡などが多くの技術が開発されている。

■ 光学顕微鏡の構成

顕微鏡は凸レンズを二枚組み合わせることで標本を拡大し、観察する装置である。標本に近い凸レンズを対物レンズとよび、これは標本を1~100倍くらいまで拡大して実像を作る。もう一方のレンズを接眼レンズとよび、対物レンズによってつくられた実像をさらに8~15倍まで拡大して虚像を作る。そしてこの虚像が網膜に映る。光学顕微鏡はこのほかに標本を照明するための光学系とそれらを支え能力を発揮させるための機械系から構成される。

■ 光学系の特徴と性能

1. 倍率

顕微鏡では対物レンズで拡大された像をさらに接眼レンズで拡大するため、顕微鏡の総合倍率 M は以下の式で表わすことができる。

$$M = M_o \times M_e$$

(M_o : 対物レンズの倍率 M_e : 接眼レンズの倍率)

2. 実視野

接眼レンズで観察できる視野(実視野)が、標本面上でどれくらいの大きさにあたるかを実視野と呼び、以下の式で表わすことができる。

$$\text{実視野} = \text{視野数} / \text{対物レンズの倍率}$$

3. 開口数

開口数は通常 NA と呼ばれ、対物レンズが光を集められる範囲を指す。開口数はレンズによって0.1~1.6程度の値をとる。レンズが同じ倍率であれば、開口数が高いほど明るさや分解能の点で優れている。開口数は以下の式で表すことができる。

$$\text{開口数(NA)} = n \times \sin \theta$$

(n : 標本と対物レンズの間の媒質の屈折率、

θ : 標本のある一点から対物レンズに入射する光の、光軸に対する最大角度)

4. 分解能

分解能は「ごくわずかに離れた2つの点を2つとして見分けうる最小間隔」として定義される。この値が小さいほど光学顕微鏡は高分解能ということになる。分解能が不十分だと標本がぼやけてしまい正しい観察が出来なくなってしまう。分解能 Δ_R は以下の式で表わすことができる。

$$\Delta_R = 0.61 \lambda / \text{NA} \quad (\lambda : \text{光の波長} \quad \text{NA} : \text{開口数})$$

分解能は光の波長と対物レンズの開口数によって決定される。

5. 焦点深度

顕微鏡で標本を観察した場合に上下方向に一定の範囲だけピントがあう。この範囲のことを焦点深度と呼ぶ。一般的に開口数や総合倍率が高いほど焦点深度は浅くなる。

6. 像の明るさ

標本の明るさは光源の明るさだけでなく総合倍率、開口数にも影響をうける。顕微鏡では開口数は大きいほど、総合倍率は低いほど像が明るくなる。

■ 光学顕微鏡の種類

1. 形式による分類

- (1) 正立顕微鏡 : 標本の上方から観察する顕微鏡。プレパラート標本を観察する場合に用いられることが多い。
- (2) 倒立顕微鏡 : 標本の下方から観察する顕微鏡。シャーレに入った培養標本などを観察する場合に

用いられることが多い。

2. 照明方法による分類

(1) 透過照明法：標本を透過してきた照明光を観察する顕微鏡

(2) 反射照明法：照明光が試料にあたって反射してきた光を観察する

■ いろいろな観察法

1. 明視野観察

もっとも一般的な観察方法で目的に応じた染色を施された標本を観察するものである。病理検査や血液検査など広く用いられる。

2. 位相差観察

観察対象の明暗をコントラストで観察できるようにした方法で対象を生きたまま観察することができる。位相差顕微鏡は位相差の小さな物体の検出に優れており、およそ $\lambda/100 \sim \lambda/2$ 程度の小さな位相差のある微細構造の観察に適していると言われている。

3. 微分干渉観察

偏光を利用してわずかに離れた光をつくり、2つの光を干渉させて無色透明の物体を立体的に見えるようにした観察方法。

4. 蛍光観察

特殊な染色を施した標本に光を当てると標本から蛍光が発せられる。これを観察するのが蛍光顕微鏡であり、ある特定の部位のみを抽出して観察することができる。

5. 暗視野観察

特殊なコンデンサーを使用し対物レンズには直接照明光を入れずに標本からの散乱光のみが観察できるようにした顕微鏡である。実際には顕微鏡の分解能よりも小さいものまで確認ができるため微生物の研究などに用いられている。

6. 全反射蛍光顕微鏡

蛍光顕微鏡をさらに発展させた観察手法であり、カバーガラス表面から数100 nm程度の局所励起が可能となるため、バックグラウンドのきわめて少

ない高感度(高S/N)な蛍光観察を行うことができる。

参考文献

顕微鏡の使い方ノート洋土社 2011

オリンパス 顕微鏡を学ぶ

<http://bioimaging.jp/learn/cat006/>

84. 原子間力顕微鏡

20世紀の終わりにDNAナノテクノロジーという研究分野が注目を浴びるきっかけとなった立役者として、原子間力顕微鏡（AFM）を忘れるわけにはいかないだろう。DXタイルの二次元シート，そしてDNAオリガミスマイリーのAFM像は，それだけ世界に衝撃を与えたのだ。

■ 走査型プローブ顕微鏡（SPM）

DNAナノテクノロジーで欠かせないAFMは，広く走査型プローブ顕微鏡（SPM）の一つに分類される。SPMとは，測定対象と様々な相互作用する微細な探針（プローブ）を，走査（スキャン）しながら物質の微細構造を測定する顕微鏡である。SPMには，探針と測定対象との間の電気的な相互作用を利用する走査型トンネル顕微鏡（STM），光学的な相互作用を利用する近接場光顕微鏡（NSOM）などがあり，AFMはその名の通り，測定対象との原子間力を利用して，試料の表面形状を測定する顕微鏡だ。原子間力とは，静電相互作用やファンデルワールス相互作用など，原子や分子の間で働く相互作用をひっくるめた表現である。

AFMは多くのメーカーから市販されており，特にBruker社のMultimode 8やDimension，アサイラム社のCypher，RIBM社のNanoExplorerなどは，DNAナノ構造体の観察実績が豊富だ。



Bruker 社製 Multimode 8/Nanoscope V

■ 測定原理

機種にもよるが，AFMの主要な構成要素は，

1. カンチレバー（探針，プローブ），
2. スキャナー，
3. 光てこ式変異検出装置，
4. コントローラー

である。

カンチレバーは一般的に，半導体加工技術で作成された数ミリメートル各の小さなチップである。本体から突き出た長さ100 μm 程度のレバーの先に，先端の直径が10 nmよりも細い，ピラミッド型もしくは円錐型の非常に微細な針が形成されている。この針の先端部と測定対象の表面との相互作用によって生じるカンチレバーの微細なたわみを検出することで，装置は探針と試料表面との距離をはかるのだ。

カンチレバーを取り付けるカンチレバーホルダーの下に通常配置されているのがスキャナーで，測定したいサンプルはスキャナーの頭部に取り付けられることが多い。測定の際には，このスキャナーが前後左右，さらに上下に小刻みに振動することで，カンチレバーがサンプル表面を「走査（スキャン）」する。スキャナーにはx軸，y軸（前後左右）とz軸（上下）の動きを生み出すための圧電素子（ピエゾ）がとりつけられており，コントローラーからの電気信号により，厳密に動きが制御されている。ナノメートルの精度で動作するようにできているため，スキャナーは非常にデリケートな部品である。大事に取り扱おう。

スキャナーとは逆に，通常カンチレバーホルダーの上部に配置されているのが，光てこ式変異検出装置である。この部品は，レーザー光源とミラー，さらに4分割フォトダイオードからなっている。「光てこ」という名前は，カンチレバーの微細なたわみをレーザー光を使って拡大して検知するしくみに由来する。手の指でキツネやハトの影絵をつくるところを想像してもらいたい。光源から手までの距離よりも，手から壁までの距離を大きくすれば，影絵を自由に拡大できるだろう。同じように，カンチレバー

にレーザー光を当てて、反射してくる光があたる位置を速くで観察すれば、カンチレバーのたわみが非常に小さかったとしても、反射光の変位はかなり大きくなる。4分割フォトダイオードはこの変位を検出するために使われる。当初は反射光がフォトダイオードの中央にあたるように、すなわちフォトダイオードを4分割した上下（vertical）と左右（horizontal）で光の検出強度の差がなるべく小さくなるように、ミラーなどを使って反射位置を調整しておく（この作業を laser alignment という）。試料表面と探針が近づいてカンチレバーがたわむと、フォトダイオードにあたる反射光の位置が中央からずれる。結果として、フォトダイオードの上下もしくは左右の検出強度の差が大きくなり、その程度から、電気信号を受けたコントローラーがカンチレバーのたわみを見積もれるのだ。

コントローラーは、この光でこ式変異検出装置からの信号を元に、探針と試料表面の距離をなるべく一定距離に保つよう、スキャナーの z 軸ピエゾに信号を送って試料の高さを調節する。このときの高さ情報が、まさに AFM 像そのものになるのだ。

DNA などの柔らかい生体材料をイメージングする場合には、さらにカンチレバーも細かく振動させて試料表面をトントン叩いていく、タッピングモード（ダイナミックモードともいう）で測定することが多い（これに対して、カンチレバーを動かさずに測定する系をコンタクトモードという）。

■ 測定手順

それでは実際に DNA ナノ構造体を AFM で観察する手順を説明しよう。ただし、製造メーカーによってパラメーターの名称がバラバラであるなど、機種によって AFM の細かい操作法は異なるため、本稿ではおおまかな測定の流れだけを説明する。

1. マイカ（雲母）の劈開

通常、DNA ナノ構造体は、層状構造をしていて、非常に平らな表面を提供できるマイカ（雲母）に吸着させて測定する。マイカは例えば、ニラコ社 (<https://nilaco.jp/>) から購入できる（天然マイカ #

990065）。まず小さく切ったマイカを、ホットメルトグルーや耐水性の両面テープ、あるいはマニキュアなどでサンプルホルダーに接着する。マイカの表面にセロハンテープを貼り付け、これをゆっくりひきはがすと、マイカの最上層のみを引きはがすことができる。これが「劈開」という操作で、新しく現れた面は、AFM で見ても非常に均一、かつ清浄だ。絶対に触らないように注意。

2. DNA ナノ構造体の吸着

DNA オリガミをはじめとする DNA ナノ構造体は一般的に、リン酸ジエステル結合の負電荷を中和できる Mg^{2+} を含んだ溶液で形成される。実は、DNA ナノ構造体のマイカへの吸着は、単にこの溶液をマイカに滴下するだけで良い。マイカの表面はやはり負電荷を帯びており、溶液に含まれる Mg^{2+} は DNA ナノ構造体の負電荷とマイカ表面の負電荷を同時に中和するとともに、両者を橋かけしてくれる。その吸着力は、AFM の探針で叩いてもちょっとやそっとでは剥がれないほど強い。

乾燥状態では変型しやすい DNA ナノ構造体の AFM 測定は、液中で行うことが望ましい。ここで使う溶液にも Mg^{2+} が必須であることに注意。通常は、構造体を作ったときの緩衝液をそのまま使う。

3. カンチレバーのセットとレーザーあわせ

ピンセットなどで慎重にカンチレバーをホルダーにセットし、装置にとりつける。フォトダイオードの信号を見ながら、レーザーの位置を合わせる。機種によっては、このあとカンチレバーの共振周波数あわせなどをする。

4. サンプルのセットとアプローチ

サンプルホルダーをスキャナーにとりつけ、スキャナーの高さを調整して、試料表面近傍までカンチレバーを近づける（アプローチ）。

5. 測定したい位置に微調整してスキャン開始！

参考文献

[1] 「ナノテクのための物理入門」ナノテクノロジー入門シリーズ III, 日本表面科学会編, 共立出版

葛谷明紀（関西大学）

85. 電子顕微鏡

DNA ナノ構造は通常の光学顕微鏡の分解能以下のサイズである場合が多いので、微細な構造を観察するには電子顕微鏡が用いられることが多い。

■ 電子顕微鏡について

光学顕微鏡では主に可視光をあて、像を得ているが、電子顕微鏡(電顕)では、電子線を試料にあてる。像の分解能は基本的には用いる電磁波の波長によるので、非常に短い波長を持つ電子線を用いる電顕では、分解能が高くなる。例えば、TEM において加速電圧が300KV の時の電子線の波長は 0.00197nm であり、光学顕微鏡で用いられる可視光(400~800nm)と比べると非常に短いことが分かる。また、光学顕微鏡ではガラスでできたレンズを用いるが、ガラスは電子線を通さないため、電顕では、磁場(コイル)を使って電子線を操作する。このため、安定した電子線を作るための高性能電源や、顕微鏡内を真空に保つ機構が必要となり、光学顕微鏡と比較すると大きな筐体となる(特に TEM. SEM は卓上型も開発されている)。最初の電顕は 1931 年にドイツのエルンスト・ルスカ等によって開発された。日本では 1940 年に大阪大学の菅田榮治によって最初に作られた。

■ 透過型電子顕微鏡(TEM)

透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope; TEM)は電子線を観察対象に照射し、透過してきた電子を、蛍光板やフィルム、CCD(CMOS)カメラで撮影する。できるだけ薄い試料の方が、観察したい部分のみを観察できるので、細胞等は切片に切って、観察する。

■ 走査型電子顕微鏡(SEM)

走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope; SEM)も TEM 同様に電子線を観察対象に照射するが、透過電子線ではなく、反射してきた電子や二次電子を観察する。観察の際は、電子線を全面に照射するのではなく、試料の一部分を少しずつ走査(スキャン)

しながら観察する。その際、導電性でない試料は帯電(charge up)が問題となる場合があるので、金等の薄膜を蒸着してから観察する場合も多い。

■ 観察方法

TEM の場合は、グリッドと呼ばれる多数の孔が開いた金属板の上に試料を載せる。具体的には、グリッドの孔にプラスチックの薄膜を張り、炭素で補強(カーボン蒸着)した物の上に試料を載せる。加工済みグリッドは市販されているので、基本的には、サンプルを載せるだけで良い。

SEM の場合は導電性の板の上に試料を貼り付けて観察する。貼り付ける際は、カーボン両面テープ、銅薄膜粘着テープ等を用いる。

■ ネガティブ染色

生物は主に、水素(H)、炭素(C)、窒素(N)、酸素(O)等の軽い元素でできているので、電子が散乱されにくく、透過しやすい。このため、コントラストがつかないので、元素が大きく電子が散乱しやすい重金属で染色して、コントラストをつける。

ネガティブ染色では、その名の通り、試料そのものではなく、試料の周辺を染め、コントラストをつける。具体的には、グリッドに載っている試料に重金属溶液を加え、しばらく待った後に余分な染色液を吸い取ると、重金属が、試料と支持膜との間や、凹凸した試料の凹部に残留する。これらの重金属は電子を散乱し、この部分が影のように見える。一方、生物試料は電子が透過するので、影の縁取りの中に試料が明るく浮き上がって見え、ネガフィルムのように逆のコントラストに試料が染色されて見える。固定や包埋などの前処理が不要で、簡単に観察できるので、DNA ナノ構造の観察では良く用いられる。

■ クライオ電子顕微鏡

試料を凍らせて観察する手法であり、TEM と低温 (-160~-270 度)のまま試料を観察する設備を備えている。

通常の TEM 観察では、試料を染色するため、構造が壊れてしまったりするが(例えば、上述のネガティブ染色では、試料を乾燥させて観察する際に構造が壊れやすい)、クライオ電顕では、瞬間的に試料を凍らせるので、試料へのダメージが少ない。実際の作業では、試料をグリッドに載せた後、余分な溶液を吸い取った後、液体エタン(-180℃)等で急速凍結する。急速に凍結させる事で、凍結過程での氷の結晶成長による、試料へのダメージを抑える。凍結した試料は液体窒素(-180度)や液体ヘリウム(-270度)を用いて凍った状態を保ったまま、電顕の試料室に移し観察する。

クライオ電顕では、試料の損傷を避ける為に、弱い電子線を照射する一方、多数の画像を取得し、平均像を得ることでSNの良い画像を得る。その際は、2次元画像から3次元画像を再構成するが、複数の方法がある。

ここでは、DNA ナノ構造で用いられる単粒子解析の方法を取り上げる。他に螺旋対称性を利用した方法、2次元結晶を利用した方法等がある。

単粒子解析では、歴史的にはリボソーム等の構造解析に用いられてきた方法で、分子が全て同じ形をしている仮定し、非常に多数の分子の平均像から再構成する方法である。その際、氷の中に凍結されている分子が様々な方向を向いており、2次元の画像の中に、様々な方向から射影された分子構造が写っている事を仮定している。別のアプローチに分子を似たような形をしたもの同士で分類し、平均像を得る、単粒子解析の方法もある。

コラム 生きた生物を電子顕微鏡で観察する

電顕は真空下で観察するので、水分等が蒸発し、生きた生物を観察できないとされてきた。しかし、近年、界面活性剤をナノスーツとする事で、動いている昆虫の観察が可能となった。

生物の表面を観察する SEM は高真空(10^{-5} ~ 10^{-7} Pa)が必要である。近年は真空度を下げる事で(10^{-10} Pa), 特殊な生物は観察が可能となってきたが、分解能も悪く、なかなか実用に耐えなかった。また、クマムシのように特殊な乾燥状態になる事で、様々な極限環境に耐えられる生物もいるが、動いている様子を観察する事はできなかった。浜松医大の針山孝彦教授のグループは界面活性剤(tween 20)を昆虫(蚊の幼虫やハムシ)にまぶし、プラズマ処理を施す事で、60分以上、生きたままの状態を観察する事に成功した。また、観察後に取り出して飼育すると、成虫になった事から、ダメージも少ない事がわかった。これは、~100nmの厚さの薄膜が表面を覆うことで、ガスや水分の蒸発が防がれているからと考えられる。

現在の所、ナノスーツは昆虫(気門と呼ばれる器官で呼吸をしており、しばらく呼吸をしなくても生きていられる)にしか適用が成功していないが、将来は、動物にも適用できるようになるかもしれない。

原著論文では、生命の起源についても議論されており、興味があれば、どうぞ！

Takakua Y et al., A thin polymer membrane, nano-suit, enhancing survival across the continuum between air and high vacuum. PNAS. 2013;7:110(19):7631-5. doi: 10.1073/pnas.1221341110.

参考文献

[1] 医学・生物学電子顕微鏡観察法, 丸善(1982/01); 日本電子顕微鏡学会関東支部編 ISBN-13: 978-4621026465

多田隈尚史 (京都大学)

86. 微粒子測定

本稿では、①微粒子の粒径分布をブラウン運動の原理で測定する「動的光散乱法」、および②粒子がもつ電荷を電気泳動の原理で測定するゼータ電位測定法について、概説する。

■ 微粒子測定の概要

微粒子とは文字通り、目に見えない小さな粒子のことであるが、界面活性剤が形成するミセルや、糸まり状の高分子、ナノロッド、DNA オリガミ、細胞、ウイルスなども微粒子と見なすことができる。それらは分析、機能素材、ドラッグデリバリーなど多くの場面で登場する。微粒子を合成したり、何かの用途に用いたりする場合、それが意図した通りの微粒子であるかを確かめる必要がある。

微粒子を特徴付ける要素としては、形状、粒径、粒径分布、表面電位、比表面積、化学組成、結晶構造などが考えられるが、本稿では、溶媒に分散した微粒子を対象として、その粒径分布を測定する動的光散乱法および、粒子がもつ電荷を測定するゼータ電位測定法について概説する。微粒子の情報を得る方法には他にも、X線小角散乱、静的光散乱、各種顕微鏡による観察などがあるが、これらは他章や文献を参照されたい。

■ 動的光散乱法

何が分かるか：動的光散乱法では、溶媒に分散した数 nm~数 10 μm の微粒子の粒径分布が計測できる。散乱法の特徴は統計的な情報が短時間で簡便に得られ、反応過程や生きた細胞などをその場観察でき、nm スケールの分解能をもつ点である。対照的に、顕微鏡では、個々の粒子は観察できるものの統計的な情報を得るには手間がかかる。光学顕微鏡では分解能が足りず、電子顕微鏡では液中観察が出来ず、原子間力顕微鏡では基板に付着したものしか観察できない。

測定原理：動的光散乱法では、粒子のブラウン運動を解析して、粒子の大きさに関する情報を得る。粒子のブラウン運動の速さは、絶対温度 T 、粒子の直

径 d 、溶媒の粘度 η に依存する。アインシュタイン・ストークスの理論によると、直径 $2r$ の球状粒子の場合、ブラウン運動の速さを示す拡散係数 D は

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta(2r)} \quad (1)$$

となる。ただし、 k はボルツマン定数である。したがって、ブラウン運動の様子を観察して拡散係数 D を計測できれば、(1)式から粒子の直径 $2r$ を求めることが出来る。この式は、球状粒子にしか当てはまらないはずだが、不定形の粒子であってもこの式で解析し、 r を求めることが出来る。このように求めた r は流体力学的半径と呼ばれる。

動的光散乱では、ブラウン運動の解析をするとは言え、粒子1つ1つの運動を観察するのではない。粒子にレーザー光を照射すると、その光は粒子に散乱される。散乱光強度 $I(\theta)$ は、ブラウン運動によって時間 t の関数として揺らぐため、その揺らぎの様子を測定し、全ての粒子の統計情報を一度に得る。小さな粒子ほど、ブラウン運動が早いため、散乱光強度の揺らぎも早くなる。この $I(\theta)$ を以下の式

$$G_2(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2)$$

によって自己相関関数 $G_2(\tau)$ に変換する。 $\langle \rangle$ は平均を表す。 $G_2(\tau)$ は、時間 τ 経過後の粒子の位置が、元の位置から統計的にどれだけ近い（相関があるか）を示し、時間 τ が経過すると $G_2(\tau)$ の値は小さくなりゼロに近づく。単分散の球状粒子の場合、 $G_2(\tau) = \exp(-\gamma\tau)$ となり、片対数グラフ上で直線となる。直線の傾き γ と拡散係数 D の間には

$$\gamma = \left[\frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin\theta \right]^2 D \quad (3)$$

の関係がある。但し、 λ_0 はレーザー光の波長、 n_0 は溶媒の屈折率、 θ は散乱角である。したがって、

この式を用いて γ から D を求め、最終的に(1)式により、粒子径 $2r$ を求めることが出来る。

粒子径に分布がある場合は、 $G_2(\tau)$ は、様々な粒径に対応する $G_2(\tau)$ が足し合わされた形状になるが、キュムラント法やヒストグラム法などによって適切に解析を行えば、粒径分布としてデータを得ることが出来る。

測定法： 溶媒に数 wt% 以下の濃度で微粒子を分散させたコロイド溶液数 mL をサンプルとする。濃度が濃すぎると多重散乱とよばれる現象が起こるので、希薄にした方が良いが、薄すぎるとシグナル強度が弱くなりすぎる。

このサンプルをガラスセルに入れて装置に設置する。適切な散乱光強度になるようにピンホール径、光フィルタ、散乱角（通常は 90° ）などを設定し、またサンプルに合わせてフォトンパルスの間隔、測定時間、測定繰り返し回数、温度などの測定パラメータを設定する。(1)式や(3)式を用いて解析するので、測定温度での溶媒の粘性率 η と屈折率 n_0 の値をあらかじめ調べて、解析用パラメータとして与えておく必要がある。市販の装置であれば、パラメータを設定し測定開始ボタンを押せば、測定と解析を自動的にを行い、粒径分布のヒストグラムなどが出力される。

■ ゼータ電位測定法

何が分かるか： 溶媒中の微粒子はほとんどの場合、少なからず帯電している。その周りは反対電荷のイオンが取り巻き、電気二重層と呼ばれるイオン雲を形成している。帯電状態は pH などによっても変化し、微粒子の分散性や機能などに大きな影響を与えるため、その定量的評価は重要である。しかし微粒子の表面電位は直接測定できないので、代替の指標としてゼータ電位 ζ が測定される。ゼータ電位は、表面電位とほぼ同等の意味と考えて差し支えないが、厳密にはコロイド科学等の参考書を参照したい。

測定原理： ゼータ電位測定は帯電粒子の電気泳動現象を利用して行われる。電気泳動とは、帯電粒子を電場 E [$V \cdot m^{-1}$] の中におくことで、静電的な力と摩擦

力の釣り合いによって、粒子が一定速度 V [$m \cdot s^{-1}$] で移動する現象である。このとき、電場 E あたりの移動速度 V として電気泳動移動度 u [$m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$] = V/E と定義されるが、この u と ζ の間には、

$$u = (\epsilon_0 \epsilon_r / \eta) \zeta \quad (5)$$

の関係がある。ただし、 ϵ_0 は真空の誘電率、 ϵ_r は溶媒の比誘電率、 η は溶媒の粘性率である。この(5)式を Smoluchowski 式と呼ぶ。他にもこの式に補正を加えた Henry 式や Huckel 式も知られている。これらの式を用いれば、電気泳動移動度 u の測定結果から、 ζ 電位を求めることが出来る。

電気泳動を利用したゼータ電位測定には、電気泳動を顕微鏡で直接観察する方法と、レーザードップラー電気泳動法がある。後者の装置では、移動する粒子がレーザー光を散乱する際に、移動速度に応じたドップラー効果によって散乱光の波長が僅かに変化を利用することを利用する。詳しい説明は、文献を参照願いたい。

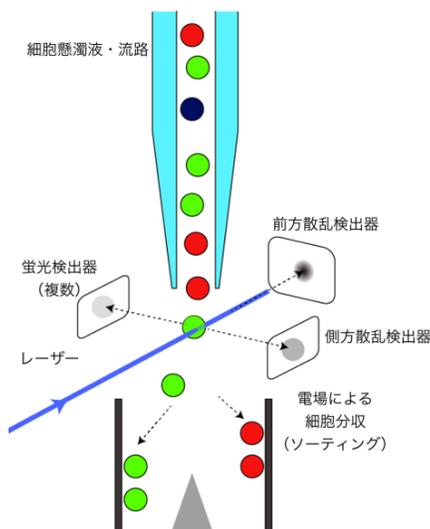
測定法： レーザードップラー電気泳動はほとんど自動化されているので、サンプルセルに試料を導入し、パラメータを指定して、測定するだけである。通常、あまり濃厚な試料は測定出来ないが、最近では濃厚系に対応した装置も登場している。水系だけでなく有機溶媒系でも測定可能である。

87. フローサイトメータ／セルソータ

細胞の定量のために開発された計数技術である。細胞の示す光学的性質（前方散乱，側方散乱，各色蛍光強度）を個々の細胞すべてに対して測定し，分布を描くことで細胞群の性質を評価する（フローサイトメータ）。さらにそのデータに基づいて細胞を生きのまま選別を行う（セルソータ）装置である。

■ はじめに

Shawn D. のモルシップが，フローサイトメータを用いて細胞選択性を示していた[1]ことは記憶に新しいだろう。BIOMOD は生体分子デザインコンテストである。作成したものが生体分子である以上，その対象は生きて培養細胞や人工細胞モデル（リボソーム(☞ 52, 89)になることが多いだろう。デザインした分子が完成したなら，愛でるだけでなくターゲットに作用させたいのが人情である。デザインした生体分子は~数百 nm スケールで，その評価は電気泳動や AFM，電子顕微鏡で行われる。一方，作用させる対象のサイズが数~数十 μm である細胞やリボソームの場合，光学／蛍光顕微鏡によって観察される。顕微鏡像は個々の細胞を詳細に定性的に表現するが，しかし多数の集団としての性質を定量的に評価したい場合がある。多数のサンプルを撮影して画像処理（☞58）を行い平均値や分布の確からしさを求めねばならず，特に細胞間の個体差が大きい場合苦労する。顕微鏡像は 200 細胞も撮影・解析したら半日がかりでもうクタクタである（個人の感想）。



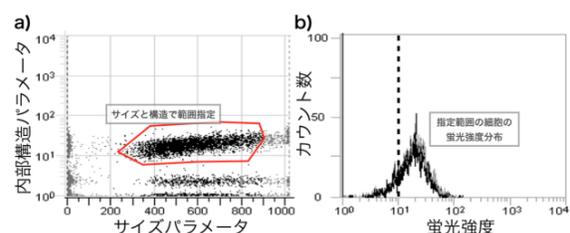
個々の細胞の情報をできるだけ多数求め，その情報をもとに生かしたまま選別できる機械が，フローサイトメータ/セルソータである[2]。 10^4 ~ 10^5 にも細胞を短時間（数分~1 時間）で測定できる。

■ 装置概要

前図に測定原理を示す。細胞は，分散させると直径十数 μm のコロイド粒子とみなすことができる。コロイド粒子を低密度で流す流路を横切ってレーザーを照射すると，大きさ・密度によって特徴的な散乱パターンが発生する。これを用いて細胞の大きさ・密度の分布を求める。その情報に基づき，個々の粒子から得られる各種蛍光の強度を求め，プロットするのがフローサイトメータである。サイズ分布を細胞孔部の電気伝導度で求めるモデルもある[3]。セルソータは，フローサイトメータからの情報にしたがって細胞を分取する。

■ 実例

次に測定例を示す。



a)の横軸・前方散乱(FS)は細胞の大きさの目安となり，縦軸・側方散乱(SS)は細胞の密度分布（内部構造の複雑さ）の目安となる。この分布の中で，ほどよい大きさでほどよい密度のところに生きて細胞がいる（死んだり破裂した細胞はこの範囲から外れる），ということが判っているのだから，その範囲内に入る粒子について，各種蛍光強度を粒子ごとにカウントする。b)の横軸が蛍光強度，縦軸が頻度である。横軸

が log であることに注意しよう（線形にも出来る）．
蛍光の励起～検出ラインを複数持っている機体では、ある蛍光シグナルの強度範囲を指定して、別の蛍光シグナルでさらに絞り込むことも可能である．例えば、核が正常でミトコンドリアが正常で特定の部位に GFP が発現している細胞のみをスクリーニングし、次の培養にまわす、という品質管理ができる．また、細胞サイズリポソーム(☞ 52, 89)もフローサイトメータによる評価が可能である．

■ 注意点

フローサイトメータは強力な武器だが、無染色の細胞のみ、や、複数の染色によって評価を行う場合は、「単色で染めた場合のみ」のコントロールサンプル(☞69)をしっかりしておくことが必須である．先の例では、ネガティブコントロールサンプルが蛍光強度 10^1 の点線より左にすべて位置、つまり自家蛍光（細胞が自前で持っている蛍光）であるという前提があり、点線より右側だけがポジティブな蛍光を示す細胞の分布ということになる．検出感度を変更することで分布は右にも左にも寄せることが出来る．感度の調整にも、コントロールサンプルは重要である．細胞側の条件、細胞数と生存数は毎回カウントして揃えることが必須である．

■ おわりに

高価な装置だが細胞系の研究分野では基本的な評価法となっており、大学で共通機器として利用することは可能だろう．遺伝子組み換えをしない限りは培養細胞の取り扱いもさほど難しくなく、マニュアルも完備されている．細胞を利用した研究に思想を引っ張られることはないが、定量的な評価を可能にする強力な装置は近い分野に数多くある．せつかくの工作物を評価するための選択肢は多くて困ることはないだろう．

参考文献

- [1] Douglas, S. M., et al., *Science* **335**, 831–834 (2012).
[2] 中内啓光 監修, 細胞工学別冊 新版フローサイ

トメトリー自由自在, 学研メディカル秀潤社(2004).
[3] ベックマンのサイトが詳しい．
<http://www.bc-cytometry.com/FCM/fcmprinciple.html>

コラム イメージングサイトメータ

計数は正義だが、見ることもまた正義．フローサイトメータは、通常の顕微鏡では追い切れない多数の細胞の性質を高速かつ定量的に分析できる点
が長所である一方で、顕微鏡に比べ空間分解能がない欠点がある（対象と相互作用する蛍光色素を複数用いることである程度の細胞内空間情報の評価は可能）．要はホンマに見たんかい！というツッコミの余地を残している．そこで、顕微鏡観察とフローサイトメータの長所をドッキングさせた装置がイメージングサイトメータである．顕微鏡像を自動で蛍光分子の強度と同時に、空間的な局在／非局在や形状など多数の情報を取得することができる（High Contents Analysis と呼ばれる）．要はプログラマブルロボット顕微鏡．ウェルプレートに対応し、細胞を剥がさないで活かしたまま経時変化を追うことも出来、レーザー共焦点による輪切り撮影も可能で、タイミングを指定して試薬の添加ができるオプションまで装備したものもある．もちろん非常に高価であるが、廉価版も多数出現している．

野村 M. 慎一郎（東北大学）

88. 表面プラズモン共鳴測定

分子デザインでは、一度の試行で大量の分子が得られる。その分子が設計通りに機能するかどうか、つまり相互作用の評価が重要である。表面プラズモン共鳴(SPR)は、分子の吸着にもとづく光物理的特性の変化を用いて多数の分子間の相互作用を簡便に定量的に測定する方法である。測れる物理量は測っておくのが吉だ。

■ なぜ表面プラズモン測定？

DNA スパイダーをご存じだろうか。DNA オリガミを足場とし、その上を DNA の三本足で歩く分子ロボ初期の傑作だが、勘で設計していきなり出来たものではもちろんなく、足と足場の相互作用を、DNA 長さや配列を変えて評価した論文[1]があり、その結果得られた美しい範囲を利用して歩かせたのが DNA スパイダー[2]なのである。その DNA 同士の相互作用測定に利用されたのが本項で概説する「表面プラズモン共鳴測定」、通称 SPR (Surface Plasmon Resonance) である。特定の物質が、対象に対する吸着・脱離の量、その時間変化、結合定数と解離定数を求めることができる。

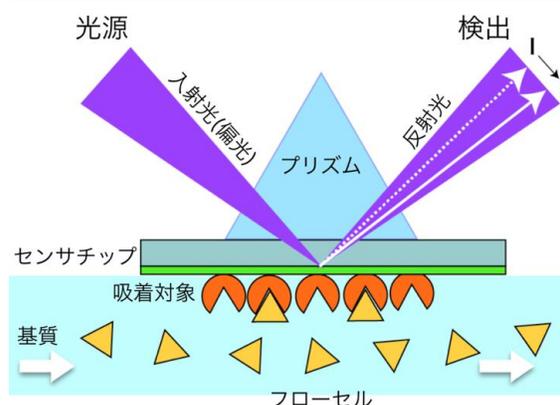
■ 表面プラズモンとは

プラズモンとは個体プラズマのことで、表面プラズモンとは金属の表面に局在する電子波モードの一種である。主に金を蒸着したガラス面から入射した光が全反射する際、表面プラズモンが生じ、薄膜近傍の表面状態との共鳴によって反射光の特定の角度成分に極小部分が生じる。このいわば「光の谷」の角度の変化を測定するのが SPR である。この角度が、表面への物質吸着量の大小に応じて鋭敏かつリアルタイムに変化する、というのがこの測定方法の肝である [3]。

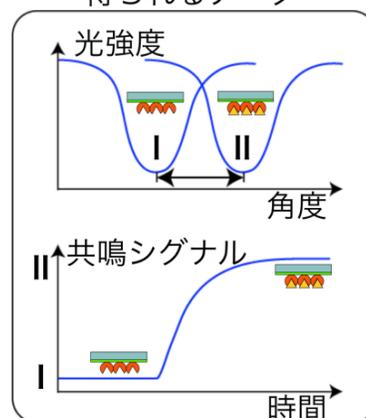
■ 測定装置の例

実機として有名なものが GE ヘルスケア社の BIACORE シリーズである。これを例に測定装置の概要を示す。金蒸着されたセンサチップ（消耗品）表面に、吸着対象（図中オレンジ円弧）をあらかじめ固定しておく。基質（図中黄色三角）は、マイクロ流体デバイスであるセンサチップの表面

を流れてゆく。対象への基質の吸着が生じると、センサチップ裏側に入射した偏光光が



得られるデータ



プリズムを介して全反射し、検出される。表面プラズモン共鳴によって反射光の一部には光吸収の極大部が生じており、基質の吸着によって表面の質量変化が屈折率の変化をもたらすことで共鳴シグナルが上昇する。また、基質が脱離することでシグナルは減少する。基質を「足」分子に、吸着対象を「足場」分子と読み替えると、DNA スパイダーの相互作用測定に利用できることがわかってもらえるだろう。

■ 特徴

- ・蛍光や放射性同位体などの標識が不要
- ・結合量が求められる
- ・結合速度・解離速度が求められる。
- ・多数の分子を一度に解析できる
- ・マイクロ流路を使用しており，測定にかかる時間が小さく，またサンプル消費量が少なくすむ。

■ 得られるデータ例

下記のような時間経過グラフとして得られる。縦軸は（表面の）質量変化量とも表現される。このグラフを解析することで，傾きから結合量，結合速度，解離速度を求めることができる。センサチップは洗浄により繰り返し使えるので，データ数を増やし信頼性を上げることも容易である。

■ 注意点

得られる値は基準値に対する相対値（Relative Unit: RU）になるので，（SPRに限らないが）コントロール測定用のサンプルを必ず用意する。操作としては，非使用時に緩衝液を枯らさない。乾燥して流路に塩や分子が吸着すると洗浄が大変でノイズ源になる。

■ その他

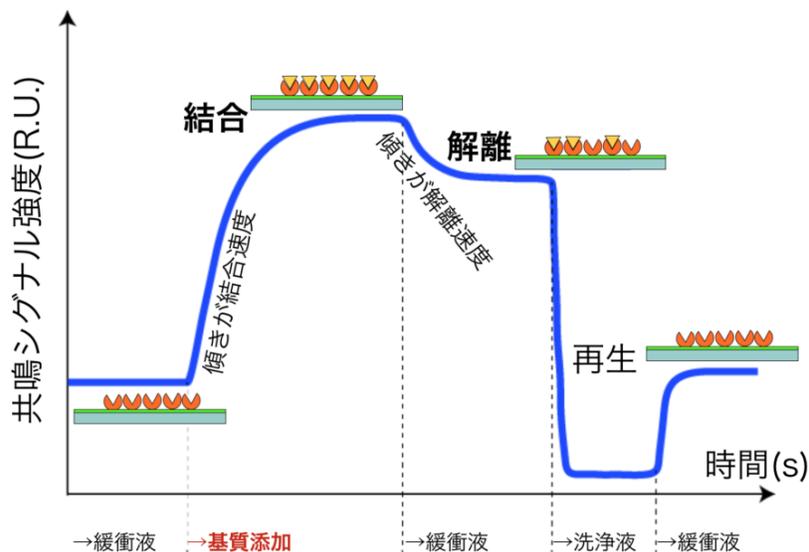
約 500 万円から（2016 年 2 月現在）と高価な設備であるが，共用設備として，また生物系，化学・

高分子系，薬学系の研究室で稼働していることが多い。DNA 分子デザインの分野では低濃度かつ貴重なサンプルを用いることも多い。その分子認識の評価を行う上で SPR はファーストチョイスになりうる。測定を頼めそうな手近な装置を探してみよう。

※同様に，吸着量の測定ができる測定法として QCM(Quartz Crystal Microbalance)水晶発振子がある。水晶振動子の電極表面に物質が付着するとその質量に応じて共振周波数が変動する原理を用いている。

参考文献

- [1] Pei, R. *et al.*, *J Am Chem Soc* **128**, 12693–12699 (2006).
- [2] Lund, K. *et al.*, *Nature* **465**, 206–210 (2010).
- [3] 永田和宏，半田宏 編，生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法: BIACORE を中心に，シユプリンガーフェアラーク東京，(1998).



野村 M. 慎一郎（東北大学）

89. リポソーム作製法

リポソームは、細胞膜を構成しているリン脂質分子が水溶液中に分散し、自発的に細胞膜と同様に柔軟性の高い二分子膜が形成されたものである。大きさは、10 nm~100 μm まで自在に作製することが可能で、リポソームの内部やリポソーム膜表面に様々な機能分子（DNA, RNA, タンパク質）を付加できる。

■ リポソーム

細胞膜の主成分であるリン脂質は、親水基と疎水基をもつ両親媒性分子で、溶液中で自己組織化し、脂質二重膜（リポソーム）を形成する(図 1)。リポソームは、小さいもので 10 nm 程度から、大きいもので 100 μm 程度まで作製することが出来る。また、10 nm~1 μm の大きさのリポソームを small unilamellar vesicles (SUV), large unilamellar vesicles (LUV) と呼び、1 μm 以上の大きさのリポソームを giant unilamellar vesicles (GUV) と呼ぶ。SUV・LUV は、光散乱や蛍光分光などの手法により小胞サイズや物質保持効率の測定が行なわれ、ドラッグデリバリーや化粧品などの医薬・産業分野で使用されてきた。一方、GUV は、サイズ・構造・組成から実際の細胞膜のモデルとして利用され、またその大きさから一個体の膜の変形ダイナミクスを直接顕微鏡観察することが可能となり、近年、リポソーム内部への生化学反応系の封入やリポソーム膜表面への機能分子の装填を行うことで人工細胞や分子ロボットを作製する研究へ応用されている。

■ SUV・LUV の作製方法

均一なサイズの SUV・LUV を得る方法にエクストルージョン法がある。薄膜の状態のリン脂質を作製したのち、水溶液を加えて、超音波処理を行う。そ

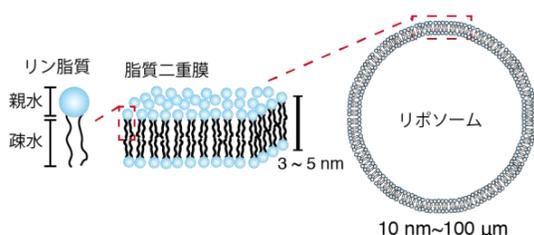


図 1. リポソームの模式図



図 2. 静置水和法による GUV 作製

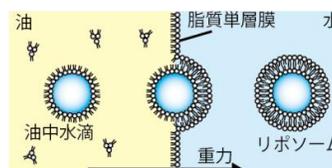


図 3. 界面通過法による GUV 作製

の後、エクストルーダー(Avanti Polar Lipids)を用い、作製したいサイズに応じたフィルターを使用し、エクストルージョンを行うと均一なサイズの SUV・LUV を得ることが出来る。また、作製出来たリポソームのサイズ評価は光散乱法で調べることが出来る。

■ GUV の作製方法

リン脂質を単純に混合しても、直径が 10 μm 程度以上の GUV を得ることは困難である。GUV を効率よく取得する方法として、静置水和法 [1] が広く用いられている(図 2)。この方法は、ガラス基板に脂質二重膜をフィルム上に薄く積層させる。その後、水溶液を加えて、自発的に、あるいは交流電場[2]をかけながら、水和・膨潤させて得る。非常に扱いやすい方法ではあるが、得られた GUV は、多重膜であったり、生理条件下の水溶液中で水和を行うと作製効率は著しく落ち、さらには、GUV 内部への目的の物質の封入効率も低いという難点も存在する。

近年、リン脂質を溶かした油相に水溶液を分散させ、界面がリン脂質に覆われた油中水滴を得たのち、これを遠心力で水相に落とし込むことで、GUV を得

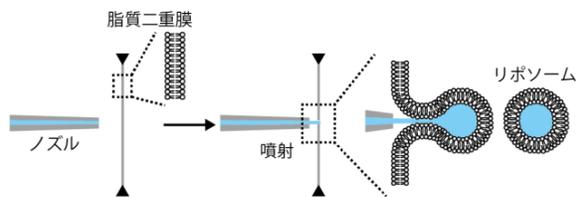


図 4. Pulsed Jetting 法による GUV の作製

る界面透過法[3]が開発された(図 3). これによって、生理条件下の水溶液でも GUV を作製することが可能であり、GUV 内部への溶液封入効率も飛躍的に上昇し、内部でのタンパク質合成[4]などが実現されている。

■ マイクロ流体デバイスによる GUV 作製

ここでは、2つの方法を紹介する。一つ目が Pulsed Jetting 法[5,6]である(図 4). この方法は、あらかじめ2つの油中水滴をコンタクトさせることで、脂質二重膜の平面膜を形成する。ガラスキャピラリーなどのノズルを近づけ、噴流を吹きあてると、シャボン玉を形成する要領で、GUV を作製することが出来る。噴流の条件を制御することでサイズを制御できること、ノズルに装填しておいた内封液をリポソーム内に効率よく封入できることが利点である。

もう一つは、著者らが開発した遠心式マイクロ流体デバイスを用いた droplet-shooting and size-filtration (DSSF) 法[7]である(図 5). 卓上遠心機と組み合わせ、高重力下において、液体が封入された微細ガラス管から微小液滴が射出される(droplet-shooting)。射出された水滴は2つの大きさの水滴を形成するが、小さい水滴のみ脂質単層膜の界面を通過しやすい効果(size-filtration)を利用して GUV を作製する。この手法の利点は、1 μL の装填液(ガラス管内に装填)から、直径 10-20 μm の GUV を 200~1000 個程度作製できる点である。この作製法は、微細加工技術を必要とせず、さらには、実験サンプル量が極めて微量で行えるため、貴重な実験試料を無駄にすることなく使える。

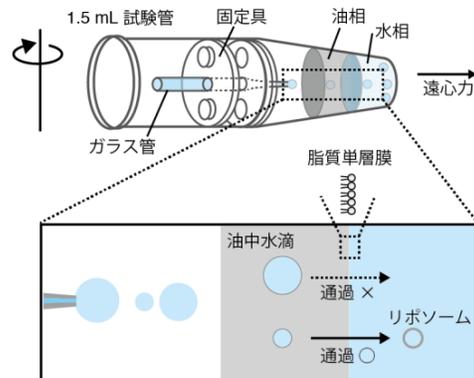


図 5. DSSF 法による GUV 作製

参考文献

- [1] J. P. Reeves, R. M. Dowben, "Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles." *J. Cell. Physiol.* **1969**, *73*, 49-60
- [2] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, "Liposome Electroformation" *Faraday Discuss.* **1986**, *81*, 303 - 311.
- [3] S. Pautot, B. J. Frisken, D. A. Weitz, "Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100(19)*, 10718-10721.
- [4] H. Saito, Y. Kato, M. Le Berre, A. Yamada, T. Inoue, K. Yoshikawa, D. Baigl, "Time-Resolved Tracking of a Minimum Gene Expression System Reconstituted in Giant Liposomes." *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1640-1643.
- [5] K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi, "Formation of giant lipid vesicle-like compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow." *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12608-12609.
- [6] J. C. Stachowiak, D. L. Richmond, T. H. Li, A. P. Liu, S. H. Parekh, D. A. Fletcher, "Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105(12)*, 4697-4702.
- [7] M. Morita, H. Onoe, M. Yanagisawa, H. Ito, M. Ichikawa, K. Fujiwara, H. Saito, M. Takinoue. "Droplet-Shooting and Size-Filtration (DSSF) Method for Synthesis of Cell-Sized Liposomes with Controlled Lipid Compositions" *ChemBioChem*, **2015**, *16(14)*, 2029-2035.

90. マイクロ／ナノビーズ技術

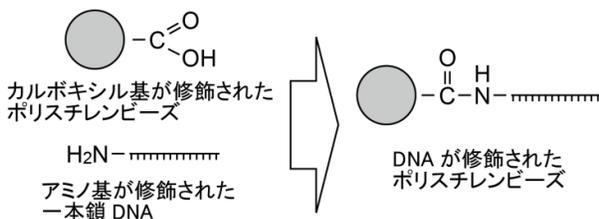
マイクロ／ナノビーズは、微小スケールでのシステムを構築する際に欠かせないツールの一つである。表面が分子修飾されたビーズ、磁性ビーズや蛍光を発するビーズなど、様々なビーズが存在する。これらのビーズをうまく利用することで、システム構築の幅が広がる。

■ マイクロ／ナノビーズとは

マイクロ／ナノビーズは、その名の通り直径が数マイクロ／ナノメートルの微小粒子である。近年では、化学技術の発展により様々な機能を持つ微小ビーズが開発され、バイオ、医療、工学などの分野を問わず広く利用されている。ここでは、様々な種類のビーズ、粒子がどのように BIOMOD で利用できるかを紹介する。

■ 分子修飾ビーズ

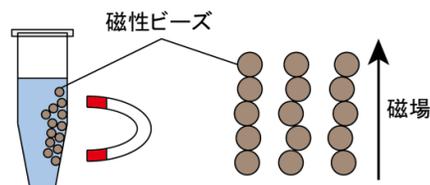
ポリスチレンを基本としたビーズの表面には、カルボキシル基、アミノ基などの官能基が化学修飾されているものが多い。このような官能基をもつビーズには、共有結合を介して望みの分子をその表面に修飾することが可能である。例えば、末端にアミノ基が修飾された DNA と、表面にカルボキシル基が修飾されたビーズを組み合わせることで、DNA 末端とビーズ表面はアミド結合する。結果として、ビーズに DNA を生やすことが可能となる。



■ 磁性ビーズ

磁性ビーズは、特に溶液中におけるタンパク質などの分子を単離する際に使用される。例として、ビオチン標識されたタンパク質の単離を考える。方法は、まず、アビジンが表面に修飾された磁性ビーズをタンパク質溶液に入れる。アビジン-ビオチン結合は、非常に強固であることが知られているので、ビオチン標識されたタンパク質は、磁性ビーズ表面に特異的に結合する。その後、磁石等を用いて磁性ビーズ

ごとタンパク質を単離することができる。このほかにも、磁性ビーズは外部からの磁場に応答して動いたり、数珠状（パールチェーン状）に整列したりと、非常に扱いやすい。



・磁石によるビーズの単離 ・磁場による整列

■ 蛍光ビーズ

蛍光色素を取り込むことで励起光により蛍光を発する蛍光ビーズも様々な場面で用いられる。蛍光色素はビーズ内にあるため、フリーな状態の蛍光色素をよりも分解・退色が少ないという利点がある。実際に 2014 年の BIOMOD で、明るく、安定した蛍光のために、DNA に蛍光ビーズを修飾して観察を行ったチームもある。

■ その他のビーズ、粒子

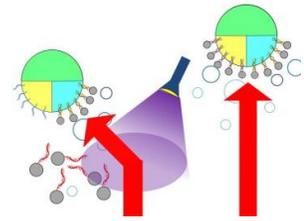
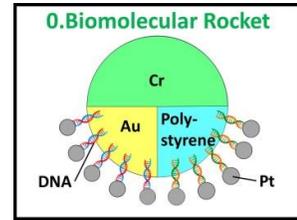
ゲル粒子は、我々が最も簡単に作製できる粒子の一つである。ゲルとは、高分子の三次元的なネットワーク構造に水分を含む素材である。実験室内で作製できることから、様々なものをゲル粒子に封入することができる。例えば、あらかじめ細胞を混ぜておいた高分子溶液を用いてゲル粒子を作製することで、細胞入りゲル粒子を得ることができる。

金や、白金などの金属ナノ粒子も、様々な場面で役立つツールとなる。金は 700~800nm の波長の光を当てると熱を発するため、金ナノ粒子に光を当てることで局所的な熱源として利用することができる。また、白金は過酸化水素水を分解し、酸素を発生させることが知られている。白金ナノ粒子を適切な位置に配置してやれば、酸素の泡を放出しながら推進

する超小型エンジンになる。

コラム Biomolecular Rocket

2012年に東工大チームがデザインした Biomolecular Rocket は、本章で紹介した、ナノ/マイクロビーズをフルに活用している。Biomolecular Rocket は、白金粒子をエンジンとした過酸化水素水中で推進する超小型ロケットである。さらに、推進中のロケットに UV ライトを当てることで、ロケットの推進方向を変えることができる。Biomolecular Rocket は二種類のマイクロビーズから構成されており、ボディにはポリスチレンビーズ (10 μ m)、エンジンとして白金粒子 (1 μ m) が使用された。ボディとエンジンは、DNA のハイブリダイゼーションによって結合されている。その結合に使われる二本鎖 DNA は二種類あり、そのうちの 하나가、アゾベンゼンを利用した光反応性 DNA である。この光反応性 DNA は UV が当たると DNA の二重鎖が解離するため、一部のエンジンが切り離され、推進方向が変わるという仕組みである。東工大チームは、このアイデアで総合第 3 位を含む 5 つの賞を受賞した。

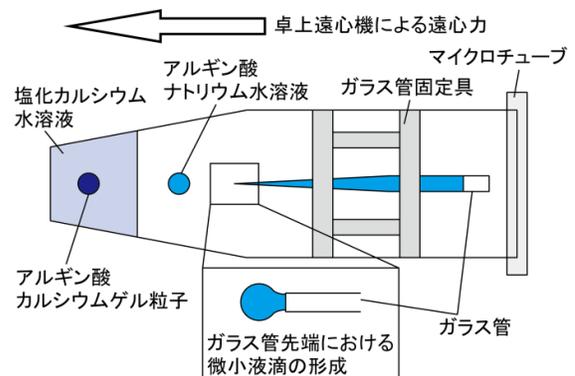


コラム マイクロゲルビーズ作製法

本章でも紹介した通り、ゲル粒子は、ポリスチレンビーズ、金属粒子などと比べて比較的容易に作製できる粒子である。そこで本コラムでは、わずか数分でマイクロゲル粒子の大量生成を実現する作製デバイスを紹介する。必要な材料は、アルギン酸ナトリウム水溶液、マイクロチューブ、ガラス管など、主に市販されているものばかりである。アルギン酸ナトリウム水溶液は、カルシウムイオンと反応してアルギン酸カルシウムゲルを形成する水溶液である。まず、アルギン酸ナトリウム水溶液をガラス管に挿入し、そのガラス管を、塩化カルシウム水溶液が入ったマイクロチューブにセットする。このマイクロチューブを卓上遠心分離機にかけると、遠心力によりガラス管先端でマイクロメートルサイズの液滴が形成される。その後、液滴はガラス管を離れ、塩化カルシウム水溶液内でゲル化する。数分の遠心で、このプロセスを何度も繰り返すことで、結果として大量のゲル粒子が得られる。さらに、このデバイスを用いて、磁性粒子や細胞を封入したマイクロゲル粒子を作製することも報告されている。

参考文献

[1] K. Maeda, H. Onoe, M. Takinoue, S. Takeuchi: "Controlled synthesis of 3D multi-compartmental particles with centrifuge-based microdroplet formation from a multi-barrelled capillary", *Advanced Materials*, 24, 1340-1346, 2012



早川雅之, 森田雅宗, 瀧ノ上正浩 (東京工業大学)

91. いろいろな分析手法(MS, NMR, CD)

ここでは核磁気共鳴スペクトル，質量分析および，CD スペクトルについて解説する．これらの手法は，新しい化合物を合成した際の合成確認や不純物の確認，また DNA やタンパク質などを変性させたりした場合の高次構造の変化などを確かめるために，一般的に用いられている手法である．

■ 質量分析 (MS, mass spectrometry)

基本原理 質量分析は，分子をイオン化し，それらを質量 m と電荷 z の比（質量電荷比 m/z ）に応じて分離・検出することで，分子量や分子構造を推定する手法である．質量分析装置（図1）は，①試料をイオン化し，生成したイオンを質量分離装置に加速導入するイオン源，②イオンを質量電荷比に基づいて分離する質量分離装置，③分離されたイオンを検出するイオン検出部からなる．イオン化と分離の方法は複数あり，目的物質によって使い分ける．

イオン化した分子を電場や磁場の中で運動させると，そのイオンの電氣量に比例した力(向心力)を受けて運動方向が曲がる（図2 左）．一方，運動方向が曲げられたイオンには，イオンの重さに比例する遠心力が働く（図2 右）．これらを利用すると，質量電荷比に応じて，検出部上の異なる位置に各イオンを到

達させて，分離・検出を行うことができる．

得られる情報 質量分析データであるマススペクトルは，横軸が質量電荷比 (m/z)，縦軸がイオンの相対存在量で表示される．ある分子 M を測定すると，イオン化の方法にもよるが，ポジティブイオン M^+ ，ネガティブイオン M^- の他，プロトン付加イオン $(M+H)^+$ や，元の分子が開裂して生じたフラグメントイオン等のピークが現れる．また，同位体イオンピークが各ピーク周辺に現れる．これらの情報を総合的に考慮することで，試料の分子量や分子構造を推定することが出来る．詳細は，専門書籍^{[1]-[3]}を参照願いたい．

■ NMR (Nuclear Magnetic Resonance, 核磁気共鳴)

基本原理 核スピン I を持つ 1H や ^{13}C などの原子は， I に比例する磁気モーメント μ をもつ．このような原子を外周磁場 H_0 の中におくと，原子核のエネルギー準位が分裂し（ゼーマン分裂），各エネルギー準位（ゼーマン準位）の差に相当するエネルギーの電磁波（ラジオ波）を吸収する共鳴吸収が起こる．磁場は原子核周囲の電子によって遮蔽されるので，分子を構成する各原子核のおかれた環境（周りにどのような原子が結合しているかなど）によって，共鳴磁場の差が生じる．NMR測定ではこの現象を利用して化合物の構造同定などを行う．

上記の原理で生じる共鳴磁場の差は僅かであるので，ppm (parts per million; 100万分の1) の単位で化学シフト δ として表す．テトラメチルシラン(TMS)などの標準物質と，対象とする原子核 X の共鳴磁場をそれぞれ H_{TMS} および H_X としたとき，化学シフトは $\delta = (H_X - H_{TMS}) / H_{TMS} \times 10^6$ と計算される． δ が大きい方が，遮蔽効果が弱いことを意味する．

NMR装置は，ラジオ波を発生する高周波発信器，強い磁場を発生する超電導磁石，共鳴吸収を検出す

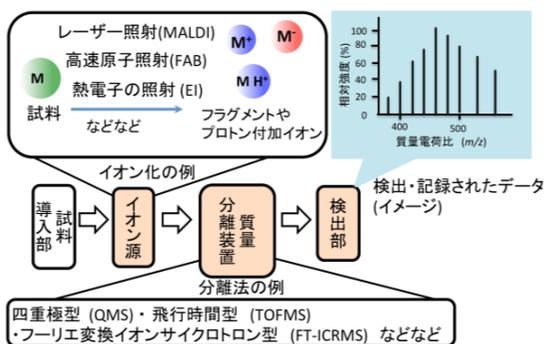


図1. 質量分析装置の概要

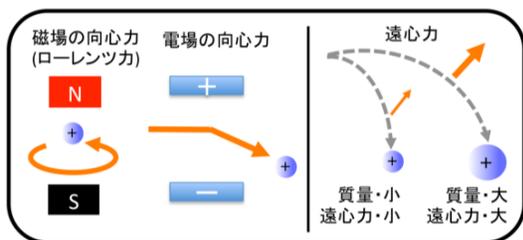


図2. イオンに働く力とイオンの動き

る検出器から構成される。ゼーマン分裂は磁場の強さに比例するため、超電導磁石の磁場強度が強いほど装置の性能が高くなる。超電導磁石を安定的に稼働させるためには冷媒の液体ヘリウムなどを常時供給する必要があり維持費がかかる。また、キャッシュカードなどを不用意に持ち込むと、強力な磁場によって情報が失われるので注意が必要である。

何が分かるか NMR スペクトルでは、化学シフト δ と吸収強度の関係図が得られ、現れたピークの化学シフト、スピンスピンカップリング、積分強度などから有機分子の構造を推定することが出来る。

エタノールの¹H-NMR測定例を図3に示す。-OH基のH原子核は-CH₃や-CH₂-に比べて弱く遮蔽されているので、 δ が大きい位置にピークが現れている。このように、化学シフトの値から、官能基の種類などが分かる。一方、-CH₃や-CH₂-のピークはいくつかに分裂した微細構造を持っている。これは、近傍の原子核との間に起こるスピンスピンカップリング現象によるものである。この分裂は、一定の規則に従って起こるので、隣の炭素原子にいくつのプロトンが結合しているか、などが分かる。また、ピークの積分強度はプロトンの数に比例している。これらの情報から、構造を推定する。

NMRスペクトルを解釈するための詳細な情報は、有機化学の教科書や各種参考書^[2]に詳しく記述されているので参考にすると良い。またChemDrawなどのソフトを使えば、ある分子構造から推定される理論的なNMRスペクトルを簡単に得ることもできる。

上記以外にも、NMRの緩和時間測定によるダイナミクス評価や、²⁹Si、³¹Pなどさまざまな核種の測定、

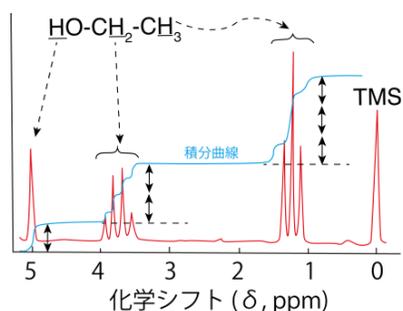


図3. エタノールの¹H-NMR測定例

固体試料の測定、2次元NMRなどがあるが、それらについては、より専門的な書籍^{[2][3]}を参照して頂きたい。

■ CD スペクトル

基本原理 光は、その進行方向と直交する面内で振動する波である。我々の目は光波の波長や振幅を光の色や強さとして認識できる。一方、光には、振動面内でどのような方向に振動しているのかによる区別ができる。直線を描くように振動するのが直線偏光、円を描くように振動するのが円偏光や楕円偏光である。円偏光や楕円偏光は、回転の方向によって右円偏光と左円偏光に分けられる。

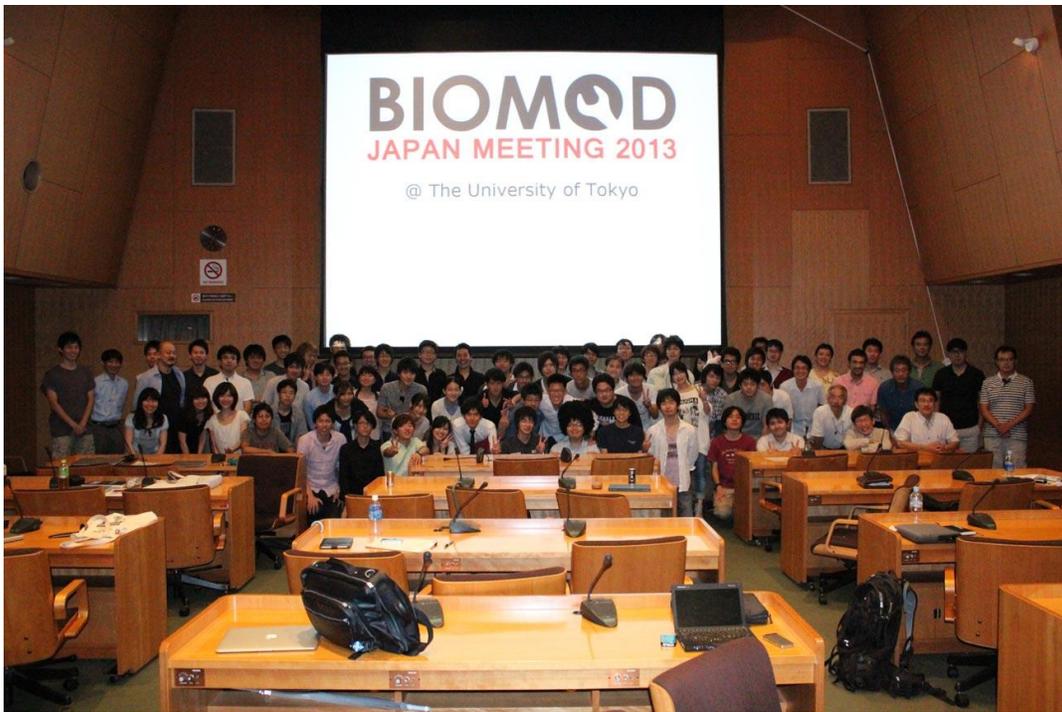
我々の目は偏光状態の違いを見分けることは出来ない。しかし、キラル炭素を持つ有機分子や、らせん構造を持つDNA二重鎖などの光学活性物質は、右円偏光と左円偏光で異なる吸光係数を持っている。

CDスペクトル(円二色性スペクトル)とは、右円偏光と左円偏光の吸光度差を測定する手段である。

何が分かるか CDスペクトルでは、右円偏光と左円偏光の吸光度差を測定することで、キラル分子のD/L比や、生体高分子が形成する高次構造に関する情報を得る。DNAやタンパク質が変性すると高次構造が変化してCDスペクトルに大きな変化が現れることがあるため、このような変化を検出するためにも有用である。

参考文献

- [1] 志田保夫ら著「これならわかるマススペクトロメトリー」化学同人、2001年
- [2] M.Hesseら著、野村正勝 監訳、「有機化学のためのスペクトル解析法」化学同人、2000年
- [3] R. M. Silversteinら著、荒木峻ら訳「有機化合物のスペクトルによる同定法—MS,IR,NMRの併用」東京化学同人、2006年



BIOMOD2013 国内大会 2013 年

第 8 章

実験してみよう（実践編）

92. DNA タイルの作製と AFM 観察

DNA タイルの実際の作製方法と AFM 観察について、そのおおまかな流れについて手順を追って紹介する。

■ DNA の分注と保存

まずは、DNA を適切なかたちで保管しなければならない。オリゴハウスに発注して合成された DNA は、一般的には糊状に乾燥した状態でチューブに入って配達される。ラベルに書いてある分量 (nmol) にあわせて、超純水 (ヌクレアーゼフリーのものが望ましい) か TE バッファを適量入れることで溶解する。(筆者の場合は、各チューブの濃度が 100uM もしくは 500uM になるように調製している。n nmol がチューブに入っているのであれば、10n ul の水をいれれば 100uM に調製できる。) かるく遠心をかけて壁面についた破片をチューブの底面に落とした後、チューブの壁を伝わせるようにして水を入れ、蓋をした後、ヴォルテックスで最低数分程度、チューブをまんべんなくまわしつつ振動させて DNA を溶かす。可能であれば、できるだけ未溶解の DNA を減らすため、数時間から一昼夜連続で振盪させつづけるとなおいっそう良い。DNA を溶解させた後、実際の溶液濃度を測定し (☞ 77,82)、それにあわせて補正をすることで、より正確な実験が可能となる。

溶解した DNA は 0.5/0.6ml チューブに分注する。すぐに使わないものについては -20 度の冷凍庫で保管する。これにより、長期間 (1 年程度以上) の保存が可能である。すぐに使うもの、また使用中のものについては 4 度の冷蔵庫に保存すると良い。保存状態にもよるが、1 ヶ月～数ヶ月程度であれば継続的に利用可能である。ちなみに、繰り返しの冷凍・解凍は DNA にダメージを与えるので望ましくない。一旦解凍したものは、なるべく冷蔵庫に保存し使い切るようにする。

■ DNA タイルの作製

材料となるそれぞれの DNA を、最終濃度が 1uM (もしくは論文のプロトコルに従った値) となるようにまぜる。このときに使うバッファ溶液としては、DNA ナノ構造の分野では、「TAE バッファにマグネシウムイオンが最終濃度で 12.5mM 加わったもの」(TAE-マグネシウムバッファと呼ばれる) が多く用いられる。5 倍濃縮 (5x)、10 倍濃縮 (10x) としたバッファをストックとして作っておくことによって、最終濃度が 1 倍 (1x) になるように調整できる。例えば、T-motif [1] のように、2 種類の DNA からなるタイルを作る場合であれば、DNA の最終濃度が 1uM、かつバッファの最終濃度が 1x とするためには、下記のようにまぜればよい:

• 10x TAE/Mg12.5mM Buffer	5ul
• Nuclease free water	44ul
• 100uM DNA (1)	0.5ul
• 100uM DNA (2)	0.5ul
total	50ul

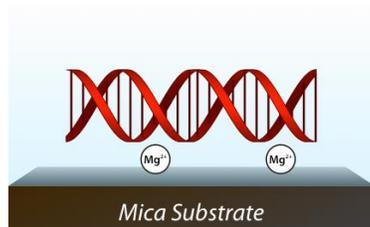
この溶液を、サーマルサイクラー、もしくは発泡スチロールに入れた熱湯をつかってアニーリングすることで構造を作製する (☞ 76)。

■ AFM 観察

AFM の仕組みや各モードなどの詳細については ☞ 84 をご覧頂きたい。一般に DNA ナノ構造の観察には液中のタッピング、およびそれと同等のモードが用いられる。(タッピングモードは米ビーコ社登録商標。ほぼ同じ仕組みであっても、商標の関係で各社名称が異なる。) ここではその手順をおおまかに紹介する。

DNA ナノ構造が形成された溶液を AFM で観察

するには、構造を（二次元平面の）基板上に吸着させる必要がある。これによく用いられるのがマイカ（雲母）である。マイカはその構造から、へき開面が原子レベルの平坦性を有していることが知られている。また、その表面が負に帯電していることから、下図に示すように、マグネシウムイオンなどの多価イオンを介すことで、DNA を静電的に吸着させることができる。（原子レベルでのこまかい吸着のメカニズムについては、じつはまだ完全には理解されていない。）



まずは、スコッチテープなどをつかって、マイカ片のきれいなへき開面を露出させる。（マイカ片をあらかじめ AFM 用の金属ホルダーに接着させておくと良い。）テープを使ってマイカを剥がしていく。きれいな面がでるまで、これを何回か繰り返す。

きれいなへき開面が出たら、そこに作製した DNA ナノ構造の溶液を適宜滴下し、構造を表面に吸着させる。適切な濃度や待ち時間、全体の溶液の分量といった点は、あとで観察した際の構造の「混雑度合い」をみつつ調節することになる。このあたりは各社のホルダーのサイズや形状、保持の仕方などによっても変わってくるので、それぞれのプロトコルに合わせて工夫してほしい。

サンプルをマイカの上に滴下、吸着を待ったのち、観察を開始する。適切なカンチレバー（探針）をホルダーにセットし、カンチレバーを観察用のバッファで濡らしたうえで、ホルダーを AFM 本体にとりつける。液中観察であるので、カンチレバーとマイカとの間に空気泡が入らないように注意する。

カンチレバーの共振周波数を測定し、もっとも

共振する値でこれを振動させつつ、マイカ表面に近づけていく。（このあたりのプロセスはソフトウェアで半自動化されていることが多い。）カンチレバーがマイカ表面に近づくと、振動の振幅などが変化するため、ソフトウェアがこれを検知し自動的に観察モードに入る。DNA は柔らかいサンプルなので、カンチレバーで引っ掛けて構造を壊さないよう、探針をなるべくマイカ表面の近くにもっていき、小さな振幅で観察するとよい。このあたりのノウハウについても各社の機械、また各カンチレバーの特性によって異なるので、具体的には各研究室のプロトコルに従うとよいだろう。

■ BIOMOD で AFM を使うには

以上みてきたように、DNA タイルを作製すること自体は比較的簡単で、とくに特筆すべきノウハウなどはない。しかしながら、AFM による観察については、ある程度の操作の慣れとノウハウを必要とする。最も確実なのは、AFM 観察をすでにおこなっている研究室（もしくは前年度 BIOMOD の AFM 担当者）に協力をお願いして、メンバーのうち 1～2 名程度を AFM 観察の担当として養成する方法だろう。すでに環境が整っていれば、数週間から長くとも 1 ヶ月程度練習することで、ある程度の観察は自分たちだけでできるようになる。また、ひとつのサンプルを見るのにも、慣れない間は数時間程度はかかってしまう（さらに、たとえ同じプロトコルでやったとしても、まったくうまく見えない場合というのも多々ある）ので、そのあたりの時間的余裕も考えながら実験計画を練る必要があるだろう。

参考文献

- [1] Hamada, S., & Murata, S. (2009). Substrate-Assisted Assembly of Interconnected Single-Duplex DNA Nanostructures. *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 48(37), 6820–6823. doi:10.1002/anie.200902662

浜田省吾（コーネル大学）

93. DNA オリガミの作成と観察

この章では DNA オリガミの作成法と評価法を記述する。

■ DNA オリガミ作成法

DNA オリガミの作成は2つの部分からなる。アニーリングと精製である。アニーリングでは、DNA オリガミの原料(scaffold と staple)を混ぜ合わせ、温度を下げながら、あるいは一定温度で構造を形成させる。精製では、余分は材料を除去する。

混ぜ方は下記の通りである。Scaffold としては、M13mp18(7249 bp, NEB 社 cat#N4040S 等, NEB 社のは 250 μ g/ml \sim 100 nM)が良く使われるが、普通のプラスミドや PCR 産物を 1 本鎖して用いる事も可能。

10 μ l の場合は、例えば、以下のように混ぜる。staple はモル比で scaffold の 5 \sim 100 倍加える。構造が単純であれば(例えば、四角いシート)、5 倍程度でも効率良くできるが、複雑な構造では、過剰の staple を加えないと上手く fold しない場合がある。

scaffold	4 μ L
staple mix	5 μ L
10 x buffer*1	1 μ L

buffer は pH 緩衝液、2 価イオン(Mg 等)、1 価イオン(Na⁺や K⁺とカウンターイオンの Cl⁻等)、キレート剤等からなる。適切な buffer は構造によって変わるが、ひとまずは下記を試してみると良い。

*1 10 x buffer 1ml

Tris-HCl (pH7.5) f.200 mM, 1M 200 μ l

MgCl₂ f.150 mM, 1M 150 μ l

NaCl f. 25mM, 1M 25 μ l

EDTA-Na(pH8) f.10 mM, 0.5M 20 μ l

アニーリングは、一定時間毎に温度を下げていく方法(定速降温法)、一定温度で構造形成させる方法(定温法, Sobczak et al. 2012)がある。より正確な構

造を作るためには、定速降温法が良いとされているが、おおよその構造を作るだけであれば、定温法の方が、短時間で作成できるので、良い。作成条件は構造によって違うので、論文に書いてある構造を用いる場合は、論文の条件を参考にすれば良い。独自の構造の場合は、条件と buffer を最適化する必要がある。定温法で作成する場合は、まず、4 時間の反応でいくつかの温度で作成し温度を決めてから、Mg 濃度や Na 濃度、反応時間を決めると効率的である。構造形成の評価はゲル電気泳動が簡便である。しかし、目的の構造ができていないかどうかは、ゲル電気泳動だけでなく、AFM や電子顕微鏡で評価する必要がある。

精製はゲルろ過カラムが楽である(Millipore 社の 100 kDa Amicon filters, cat#UFC510024 や、GE 社 MicroSpin S-300 HR Columns, code#27-5130-01 等)。丁寧にする時はゲル切り出しで行う(Douglas SM et al. 2009, Castro CE et al. 2011)。

■ ゲル電気泳動による評価

アガロースゲル電気泳動による評価は、簡便であり、また、ゲルバンドを切り出す事で精製も可能であるので、多用される(詳細は 79 を参照)。アガロースゲルは構造体によって最適な濃度が違うが、ひとまずは 1%で泳動すると良い。また、泳動時の発熱がバンドパターンを乱すので、低温室(なければ、冷蔵庫)で泳動すると、綺麗なパターンが得られる。また、構造体の維持には Mg イオンが必要であるが、濃度が高すぎると発熱の原因となるので、12mM 程度を加えたゲル buffer を用いて泳動する。その際、電気泳動は(通常の 100V ではなく)、50V で行う(ミューピッド等の高さ 6cm ゲルの場合は、1-2h 泳動)。

ゲル buffer 500mL

10x TBE 50ml
1M MgCl₂ 6ml
(10x TBE: ナカライ #35440-31, Life technologies #15581-044, Sigma #93290)

1%アガロース 50mL

Agarose 0.5g

ゲル buffer upto 50ml

(アガロース: 宝 #5003 等)

電子レンジで溶かし、型に流し込む。突沸によるヤケドに注意。三角フラスコやビンを使う。

泳動後は染色する。染色剤は EtBr(高感度、ただし発がん性), SYBR safe(Life technologies # S33102), ミドリグリーン(日本ジェネティックス #NE-MG04 か NE-MG06)等。泳動前のゲルに混ぜ込む方法もあり、時間短縮になるが、染色は泳動後にした方が綺麗である。

切り出し後に濃度が薄い場合は、PEG 沈殿を行う(Stahl E et al., 2014)。沈殿 buffer(15 % PEG 8000 (w/v), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5-8.3), 1 mM EDTA, 500 mM NaCl)と、サンプルを 1:1 で混ぜ(ただし、サンプルに事前に Mg を加え、混合後の Mg 濃度が 10mM 以上になるようにする), 16,000G で 5-25 分、室温で遠心する。

■ AFMによる評価

AFM に関しては 84 を参照。マイカ上で乾燥させた試料を測る場合と、液中で測る場合がある。

■ 電顕による評価

ネガティブ染色の観察法概略を述べる。染色剤としては、論文では、ギ酸ウラニル(Uranyl-Formate)が用いられているが、現在は輸入できない。代わりに、一般的な酢酸ウラニルを用いて観察する。

1. グリッド(フナコシ(ポリサイエンス) cat#24945)を親水処理

2. 染色液作成

3%酢酸ウラニル 27 μ L, MQ51 μ L を混ぜ、5

分間卓上遠心。そこに 1M NaOH 2 μ L を加え、すぐに vortex3 分間(混ぜた瞬間から vortex しないと沈殿する)。3 分間卓上遠心。アルミ箔で包んでその日に使う。時間が経つと針状結晶が生じて観察が困難になる。

3. グリッドにサンプル載せる

3-1. サンプルを 3 μ L 乗せ 3 分待つ(サンプル原液を 10-100 倍希釈)。この間に、パラフィルム上に染色液 12 μ L を乗せておく。

3-2. グリッド表面に触れないようにしながら、ろ紙でサンプルを端から吸い取る。

3-3. 吸収後即、グリッド表面を染色液の液滴に押し当て、グリッドに染色液を乗せる。

40 秒キープ。

3-4. グリッド表面に触れないようにしながら、ろ紙で染色液を端から吸い取る。

30 分放置。(吸い取った時点でかなり乾いているので、実際には 10 分ほどで観察可)

4. 電顕に試料をセットし、ピントを上手くあわせて観察。

参考文献

[1] Douglas SM et al., Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes., Nature. 2009;459:414-8. doi: 10.1038/nature08016.

[2] Sobczak J et al., Rapid folding of DNA into nanoscale shapes at constant temperature, Science. 2012;338:1458-61. doi: 10.1126/science.1229919.

[3] Castro CE et al., A primer to scaffolded DNA origami., Nat Methods. 2011;8:221-9. doi: 10.1038/nmeth.1570.

[4] Stahl E et al., Facile and scalable preparation of pure and dense DNA origami solutions. Angew Chem Int Ed Engl. 2014;53:12735-40. doi: 10.1002/anie.201405991.

[5] 電顕観察マニュアル 東大大学院工学部化学生命工学科 堀江 史博, 川原田 礼以良 作

多田隈尚史 (京都大学)

94. DNA ゲートの作製と観察

システムが設計通りに動いているかは、これまで説明してきた原理に基づいて実験を行い検証する。ここでは DNA の鎖置換反応で駆動するゲートを例題として、一連の具体的な作製手順と電気泳動による観察までの流れを解説する。

■ DNA 反応系の実験による検証

設計したシステムが期待通りの振る舞いを示すか、あるいは問題がある場合は原因がどこにあるか、実験によって検証を行う。分子の大きさによって分離を行うゲル電気泳動(☞ 79)は、基本となる実験操作の一つであり、繰り返し行うことが多い。

ここでは DNA を使った鎖置換によって駆動するハイブリダイゼーション連鎖反応(HCR, ☞ 27)[1]を例題として、一連の実験手順について説明する。HCRでは二つのヘアピンDNAであるH1とH2が、入力DNAであるIによって連鎖的に開かれる反応である。

■ ストックの調製

DNA を合成業者から乾燥タイプで購入した場合(☞ 72), まずは溶媒に溶かす必要がある。バッファーの条件は後で変更する可能性があるため、マスターとなるストックは純水に溶かす。対象とするシステムの濃度にもよるが、 $100\ \mu\text{M}$ の濃度にすれば十分な場合が多く、以下の組成になる。

$100\ \mu\text{M}$ DNA ストック

乾燥 DNA : x [nmol]

超純水(mQ) : $10 \times x$ [μL]

x は収量を表す変数であり、合成された DNA ごとに異なる。例えば収量が 12.4 [nmol] の場合、 124 [μL] の純水を加える。それぞれの収量に注意して、H1, H2, I の三種類の DNA で同じ操作を繰り返す。DNA を溶かす際に意識することは、遠心とボルテックスを良く行うことである(☞ 75)。均一に DNA が溶けていないと、実験毎に濃度にバラつきが出てしまう。できたマスターストックは冷凍して保存し、

必要に応じて凍結融解を行う。

マスターストックの DNA 濃度は合成業者の収量に基づいており、誤差がないとは言いきれない。等量比を可能な限り厳密に調整したい場合には、吸収スペクトルによる濃度の測定を行う(☞ 77)。以後測定した濃度に応じて補正を行う(例えば $100\ \mu\text{M}$ に調製したつもりマスターストックが実は $85\ \mu\text{M}$ だったということが有りうるので、以降の実験では測定濃度に応じて加える量を計算し直す)。

濃度が高いサンプルを作る場合にはマスターストックから直接 DNA を使うこともあるが、コンタミネーションを避ける目的でも、濃度が低くバッファーに溶かした中間ストックを調製する。HCR の場合にはそれぞれ $3\ \mu\text{M}$ の中間ストックが必要であり、I に関しては $30\ \mu\text{M}$ のストックも必要になる。調製する際の組成は以下の通りである。

$3\ \mu\text{M}$ DNA ストック

DNA ($100\ \mu\text{M}$) : 3 [μL]

$10 \times$ バッファー : 10 [μL]

超純水(mQ) : 87 [μL]

$30\ \mu\text{M}$ DNA ストック

DNA ($100\ \mu\text{M}$) : 30 [μL]

$10 \times$ バッファー : 10 [μL]

超純水(mQ) : 60 [μL]

緩衝溶液は単にバッファーと記述した(☞ 75)。HCR の場合は具体的には 50mM Na_2HPO_4 , 0.5M NaCl である。もちろん対象のシステムに応じて TAE/ Mg^{2+} や NEB バッファーなどに変更する。 $10 \times$ となっているので、すべて 10 倍の濃度で調製したバ

ッファーを使用する。

9 μ M の H1 と H2 は、それぞれ別のチューブでアニーリング(☞ 76)を行い、確実にヘアピン構造にする。論文に従う場合、アニーリングは 95°C から室温まで 1 時間のスケジュールで行う。

■ サンプルの調製

ここまでの中間ストックを混ぜ合わせ、泳動するサンプルを調製する。HCR は H1, H2 に対する入力 of 等量比によって、連鎖反応の平均的な回数が変わり、できあがる構造の大きさに差が生じる。以下の組成でサンプルを作る。

HCR サンプル

DNA H1 (3 μ M) : 10 [μ L]

DNA H2 (3 μ M) : 10 [μ L]

DNA I (3 μ M) : y [μ L]

1×バッファー : 30-y [μ L]

HCR サンプル

DNA H1 (3 μ M) : 10 [μ L]

DNA H2 (3 μ M) : 10 [μ L]

DNA I (30 μ M) : z [μ L]

1×バッファー : 30-z [μ L]

y と z は I を加える量を表す変数である。具体的には、y=0, 1, 3.2, z=1, 3.2, 10 の合計 6 通りのサンプルを調製する。今回はバッファーが 1×の濃度になっていることに注意する。

サンプルは HCR の反応を完了するために、室温で 24 時間保存し、次のステップに移る。このように、様々な組み合わせで中間ストックを混ぜ合わせ、必要な時間反応をさせることでサンプルを準備する。

今回は H1, H2, I のすべてを混ぜ合わせたが、詳細な比較実験を行う場合は、それぞれ一つだけのサンプルや、どれか一つが欠けたサンプル、反応時間が異なるサンプルを準備することもある。

■ 電気泳動

できたサンプルは電気泳動によって分子を分離し、

どのような大きさの分子ができていないか検証する。

比較のために、あらかじめサイズの分かっている DNA ラダーと呼ばれるマーカーと一緒に泳動する。DNA ラダーは例えばタカラバイオのものを使用する[2]。ただし、製品そのままでは濃度が高く、HCR サンプルよりもバンドが濃く出てしまう可能性がある。HCR のサンプルの定量性を上げるために、ラダーは 10~100 分の一程度の濃度に薄めて使用する。

以上のようにゲルの各ウェルに流すサンプルがすべて準備できたら、電気泳動のプロトコル(☞ 79)に従って実験を行う。 HCR の場合は 1% のアガロースゲル電気泳動を行う。調べたい条件によっては、ゲルの濃度、変性剤の有無などの条件を変更する。

泳動を行った結果を論文から引用したものを図 1 に示す。I の濃度が相対的に低いほど大きな高分子ができ、I がない場合は全く反応していない。

このように、バンドの位置によってシステムの挙動の定性的な評価を行う。またバンドの濃さによって、定量的な評価を行うことも可能であり(☞ 80)、反応速度や反応効率などを見積もることもある。

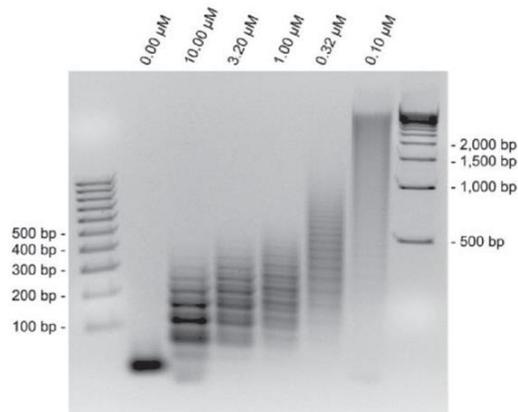


図 1 HCR の泳動結果

Reprinted from PNAS, 2004 [1]

参考文献

[1] Robert M. Dirks, Niles A. Pierce: "Triggered amplification by hybridization chain reaction", Proceedings of the National Academy of Sciences, 101, 15275-15278, 2004

[2] タカラバイオ DNA ラダー

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100003463

川又生吹 (東北大学)

95. DNA ピンセットの作製と観察

ナノスケールの構造変化を評価する手法として、蛍光共鳴エネルギー移動による観察方法がある。電気泳動とは異なり、蛍光の時間発展を追うことが可能なため、反応速度定数を測定するなど、システムの詳細な理解につながる。DNA ピンセットを例題に、一連のサンプル準備と観察について解説する。

■ 小さい時間空間スケールの変化を評価

設計したシステムの検証や評価を行う基本的な方法として、電気泳動が挙げられる(☞ 79)。電気泳動では複数のレーンを比較することで、条件の違いで反応が起きたかどうかという定性的な情報を得ることができる(☞ 80)。一方で定量的な評価を行うには、バンドの濃さを比較する必要があるが、再現良く結果を得るのは難しい。さらにレーン数に物理的な限界があるため、高い時間解像度でシステムの評価を行うことは不可能である。また大きさのほとんど同じ分子は、電気泳動では本質的に分離することができず、バンドの差として観察することができない。

電気泳動では分からないような時間、空間スケールの反応を観察する方法として、分光光度計を使った手法がある(☞ 81)。DNA システムの場合、具体的には蛍光分子と消光分子を用いた蛍光共鳴エネルギー移動を観察する(☞ 51)。 蛍光分子と消光分子がナノメートルスケールでどれくらい近くにいるか、というわずかな変化を定量することができ、時間分解能も秒のオーダーである。

ここでは DNA のシグナルにより開閉を行う DNA ピンセット[1](☞ 24)を例題に、一連の FRET 実験について解説を行う。DNA ピンセットでは構造を作る DNA が A, B, C の三種類あり、さらに開閉を行うシグナル DNA が F_0 と F_C の二種類ある。

■ サンプルの調製

まずは乾燥品で届いた DNA を、前回解説した方法(☞ 94)に従い純水で溶解して、 $100\ \mu\text{M}$ のマスターストックとする。ここから以下の組成で $20\ \mu\text{M}$ の中間サンプルをそれぞれ作る。さらに A, B, C の DNA はそれぞれ $1,1\ \mu\text{M}$ になるように混ぜ合わせて希釈する。

20 μM DNA サンプル

DNA ($100\ \mu\text{M}$) : $20\ [\mu\text{L}]$

10×バッファー : $10\ [\mu\text{L}]$

超純水(mQ) : $70\ [\mu\text{L}]$

1.1 μM DNA サンプル

DNA A ($20\ \mu\text{M}$) : $4.95\ [\mu\text{L}]$

DNA B ($20\ \mu\text{M}$) : $4.95\ [\mu\text{L}]$

DNA C ($20\ \mu\text{M}$) : $4.95\ [\mu\text{L}]$

1×バッファー : $75.15\ [\mu\text{L}]$

バッファーとして筆者の研究室では TAE/Mg²⁺を使用するが、論文では SPSC を用いていた。

入力 DNA に対するシステムの応答を見る場合は、濃度が低く量の多いサンプルに、濃度が高いサンプルを少量加え、蛍光の変化を観察する。これは希釈により蛍光分子の濃度が下がり、蛍光量が変化することを防ぐためである。ここでは例として $1.1\ \mu\text{M}$ と $20\ \mu\text{M}$ のサンプルを準備した。濃度は、蛍光分子の種類や分光計の感度などによって調整を行うが、10 倍程度以上の差を持たせる。

■ 蛍光の観察

サンプルが準備できたら、分光計による実験に進む。複数のサンプルを順序良く入力して、その都度どのように蛍光量が変化するか観察する。 DNA ピンセットの場合、A の分子に蛍光分子である TET と消光分子である TAMRA が修飾されており、最初の状態では距離が離れているため TET が蛍光している。

蛍光分光光度計のメカニズムや実験手順の詳細は別ページを読んでほしい(☞ 81)。実験で具体的にを行う操作の例として、セルに加えるサンプルの量と、待ち時間を示す。

蛍光分光光度計実験

- ① セルに $1.1\mu\text{M}$ の DNA サンプル(A, B, C)を $90\mu\text{L}$ 入れる
- ② この後十分な時間(30 分程度)待機
- ③ 装置による記録を開始
- ④ 300 秒待機
- ⑤ $20\mu\text{M}$ の F_C を $5\mu\text{L}$ 加える
- ⑥ 500 秒待機
- ⑦ $20\mu\text{M}$ の F_0 を $5\mu\text{L}$ 加える
- ⑧ 500 秒待機
- ⑨ 以下⑤~⑧を繰り返す

最初に加える A, B, C のサンプルは、アニーリング(☞ 76)をすることで確実に構造を作らせることもできるが、今回は単に混ぜて良くボルテックス(☞ 75)したものを使った。

サンプルをセルに入れた後、②において待機するのは、分光計の光源であるランプや、サンプル内の温度が安定するのを待たためである。この間に励起光と蛍光の波長やスリットの大きさなどを設定する。今回用いた蛍光分子は TET であり、励起波長と蛍光波長をそれぞれ 520nm と 541nm にした。励起光の高波長側が蛍光波長に重なっていたり、SN 比が問題になったりすることがあるため、細かな調整が必要である。スターラーにより常に攪拌されている状態にするのと、温調装置により一定の温度に保たれていることに注意する。

蛍光の値が安定すれば装置の開始ボタンを押し、蛍光値の記録を行う。まずは開いた状態での蛍光を 300 秒記録した。

その後ピンセットを閉じるシグナル DNA の F_C を加える。ピンセットが閉じ、蛍光値は減少する様子を観察する。溶液中に存在する DNA ピンセットが閉じるのを待つために 500 秒待機した。反応が終わるまでの時間は、反応速度に依存して変わる。ここでの待機時間は一概に何秒が良いとは言えないので、蛍光値が安定するまで待機するか、あらかじめ決めた時間待機する。

その後再度ピンセットを開く DNA である F_0 を加え、同様の操作を繰り返す。

■ 実験結果と評価

今回の FRET の観察により得られるデータは、横軸

が時間で、縦軸が蛍光強度のグラフになる。先ほどの方法で得られた結果を図 1 に示す。最初の蛍光値が開いた状態のものである。その後 F_C を加えることで、蛍光値が下がりピンセットが閉じる様子が分かる。さらに F_0 を加えることで蛍光が上がり、ピンセットが開いている様子が分かる。その際、溶液を加えることで濃度が減少し、蛍光の最大値が徐々に減少することに注意する。

このデータからは反応時間や速度に関する知見が得られる。具体的には二次反応の関数(☞ 39)を数値ライブラリ(☞ 60)でフィッティングし、反応速度定数を求めることができる。その際に、縦軸の蛍光強度は無次元の値であり、正規化が必要な点に注意する。

一連の実験は、酵素反応を使った DNA システム [2](☞ 33)の評価に応用することもできる。その場合は分光計ではなく qPCR 装置を使い、セルではなくチューブを用いる。他には、一つの波長だけでなく、スペクトルの時間発展を観察する応用も可能である。

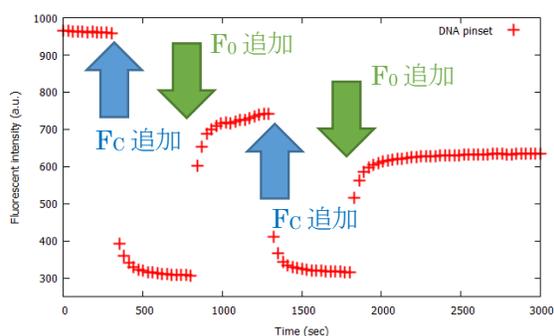


図 1 FRET の結果
(東北大学で測定)

参考文献

- [1] Bernard Yurke, Andrew J. Turberfield, Allen P. Mills Jr, Friedrich C. Simmel, Jennifer L. Neumann: "A DNA-fuelled molecular machine made of DNA", Nature, 406, 605--608, 2000
- [2] Adrien Padiac, Teruo Fujii, Yannick Rondelez: "Bottom-up construction of in vitro switchable memories", Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, E3212--E3220, 2012

川又生吹 (東北大学)

分子ロボティクス研究会編
DNA 分子デザインのすべて
BIOMOD 虎の巻 (2016 年度版)

2016 年 4 月 15 日発行

本著作物の著作権は著者にあり、CBI 学会は、本著作物に関する、
複製、配布、改変、再出版の権利を持つ。

ISBN 978-4-9903708-9-3