



Tokyo Tech



Press Release

2024年6月7日

東京工業大学

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

東北大学

理化学研究所

複数のマイクロ RNA を同時検出する 「RNA 液滴コンピュータ」の開発に成功

－細胞の中で働く微小ロボットや化学的人工知能の実現にも貢献－

【要点】

- 分子を選択的に感知する機能をプログラムした、論理演算を実行する RNA 液滴を作製
- 2つの特定の RNA が入力された場合のみ液滴が溶解する挙動を利用することで、がんのバイオマーカーとして知られるマイクロ RNA の検出に成功
- 生体や生細胞の中で、病気の診断、薬物送達、機械的動作などを行うインテリジェントな微小ロボットや化学的な人工知能を実現する技術への貢献

【概要】

東京工業大学 情報理工学院 情報工学系の瀧ノ上正浩教授、鶴殿寛岳博士研究員（学術振興会特別研究員）、范敏之大学院生（研究当時）、齊藤洋子技術員（研究当時）、京都大学 iPS 細胞研究所の齊藤博英教授、大野博久助教、東北大学大学院工学研究科 ロボティクス専攻の野村 M.慎一郎准教授、理化学研究所生命機能科学研究センターの清水義宏チームリーダーらの研究グループは、がんのバイオマーカーである特定の**マイクロ RNA**（**miRNA**、用語 1）を選択的に認識し、**AND 演算**（用語 2）の結果を出力できる「RNA 液滴コンピュータ」の開発に成功した。

細胞内部では、生体分子が自発的に集合して微小な液体状の構造物（液滴）が形成される。この**液-液相分離**（用語 3）と呼ばれる現象は、細胞の構造と機能の制御、さらには病気に深く関与している。近年では、**プログラマブルな生体分子**（用語 4）である DNA が形成する DNA 液滴の研究が進展している。もう一つのプログラマブルな分子である RNA の液滴が機能性を備えることは報告されていなかった。そこで、本研究では、ターゲットとする 2 種類の miRNA が入力されたときだけ AND 演算を実行して液滴を溶解するようにプログラムした RNA 液滴を構築し、さらにその挙動を実証することに成功した。本研究で実現された RNA 液滴コンピュータは、がん診断、薬物送達などの医薬分野への応用が見込まれる。

本研究では人工的に合成された RNA を用いたが、将来的には RNA 液滴の設計図をコードした DNA の鋳型を生細胞や人工細胞の中に導入し、細胞内の**転写**（用語 5）機構を利用して遺伝子を発現させることも可能となる。本研究成果は、細胞の中で自律的に駆動

するインテリジェントな微小ロボットや人工知能デバイスの実現に向けた重要な足がかりとなる。

本研究成果は、2024年6月3日（現地時間）に米国化学会刊行の科学雑誌「*ACS Nano*」のオンライン版で公開され、supplementary cover に採択された。

●研究の背景と経緯

タンパク質、RNA などの生体高分子は、細胞内で相互作用を通じて直径数マイクロメートルのマイクロ構造体である液滴（髪の毛の太さの 10 分の 1 程度の大きさ）を形成する。この現象は液-液相分離として知られ、近年、細胞生物学でさかんに研究されている。主に、ストレスなどへの刺激応答性、化学反応の制御、細胞小器官の形成などに関与することが判明しており、液滴の性質変化が病気の原因につながることも示唆されている。この液-液相分離の研究は合成生物学の分野に波及し、DNA や RNA の柔軟な配列設計を通じて任意の微小構造と機能をプログラマブルに形成する DNA/RNA ナノテクノロジーに立脚して、人工的な相分離液滴を構築し高機能化させる研究が、本研究グループをはじめ国内外で行われている。

水分子が集まって液体を構成するように、DNA や RNA からなる直径数ナノメートルのナノ構造体（髪の毛の太さの 1 万分の 1 程度の大きさ）も、自発的に集合し高い流動性を持つ液滴（マイクロ構造体）を形成することができる。ユニットとなるナノ構造体はモチーフと呼ばれ、アルファベットの X や Y のような分岐構造を持ち、末端同士で相互作用する。また、塩基対形成ルール（用語 4 参照）にしたがい、モチーフ同士の相互作用を自在にプログラムすることも可能である。これにより液滴同士を自在に融合、分離させることができる（参考文献 1）。近年では、特定の miRNA の組み合わせで入力されたときだけ、水と油のように DNA 液滴が DNA の種類ごとに相分離する挙動をすることで AND 演算を実行する液滴が報告されていた（参考文献 2）。

DNA 液滴の機能化を目指す研究が展開される一方で、もう一つのプログラマブルな生体分子である RNA に関しては、機能性を持たない液滴の形成が報告されているのみであった。DNA に比べると RNA は、機能および構造がはるかに多様であり、DNA より複雑な相互作用をすることが知られている。たとえば、末端にヘアピン状のループ構造を持つ RNA 同士が結合するキッシング・ループ（kissing loop、“KL”）相互作用は、遺伝子発現制御などに関わっている。昨今のパンデミックの際に多くの命を救ったワクチンで採用されたメッセンジャーRNA は、タンパク質の情報がコードされた DNA に似た分子である。他にも特定の分子に対して酵素機能を持つ RNA など RNA は様々な種類が存在し、それぞれ多様な機能を持つことが知られている。これらの RNA の機能を活かした、多様な機能・構造を発現する RNA 液滴の実現は、プログラマブルで高機能な液-液相分離液滴の発展に不可欠な一歩である。

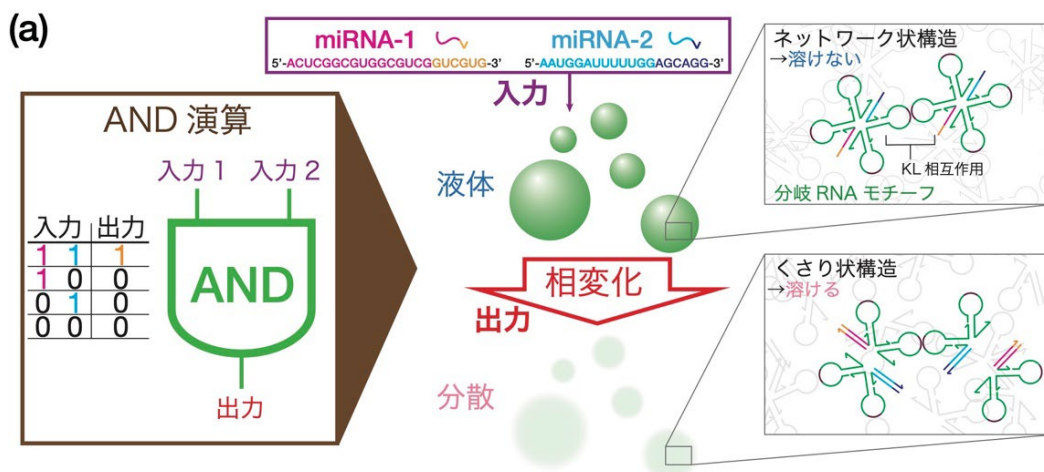
●研究成果

今回、「がんのバイオマーカーとして知られる特定の miRNA の入力に対して RNA 液滴が AND 演算を実行する」ことをコンセプトとして、「特定の miRNA が 2 種類入力さ

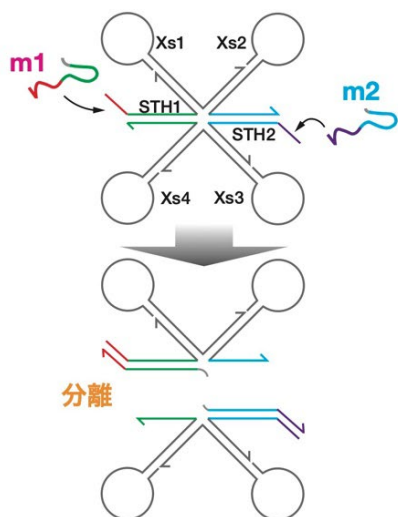
れたときだけ、RNA 液滴が溶解する」という挙動の実現を目指した (図 1a)。モチーフ間の相互作用として、ヘアピン・ループ同士の KL 相互作用を RNA 液滴の形成原理とした。

① AND 演算 RNA モチーフのデザインと働き

AND 演算 RNA モチーフ (図 1b) は、KL を含む Xs1-Xs4 の配列の他に、サイドに 2 つの突起構造 STH1 と STH2 を持っている。先端に 2 種類の miRNA (それぞれ“m1”および“m2”とする) の同色部分と結合する配列がある。例えば、m1 が入力された場合、赤の部分は STH1 の赤色の配列と結合する。これを足がかりとして、m1 の緑の部分 STH1 の緑の配列と結合し、もともと STH1 と結合していた Xs4 の緑の配列は切り離される (図 1b)。この鎖置換反応 (用語 6) が STH2 でも起こる結果、モチーフは 2 つに分離する。初期状態ではモチーフの中に KL が 4 個あるが、反応の結果得られるサブ構造には KL が 2 個しかない。図 1c に示すように、複数モチーフが結合した初期構造はネットワーク状の構造であるが、反応後はくさり状の構造へと変化する。初期のネットワーク状の構造は水に溶けにくく液滴として存在できるが、くさり状構造は水に溶けやすいため、m1 および m2 が入力されたときだけ液滴は溶解する (図 1c)。



(b) miRNA-1 (m1): 5'-ACUCGGCGUGGCGUCGGUCGUG-3'
miRNA-2 (m2): 5'-AUGGAUUUUUGGAGCAGG-3'



(c)

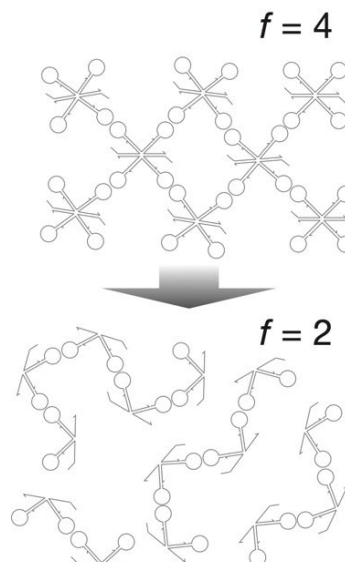


図1 入力された miRNA に対して AND 演算を実行する RNA 液滴。(a) 入力の 1 と 0 はそれぞれの miRNA が「ある」ときと「ない」ときを意味する。miRNA-1、miRNA-2 の両方とも「ある」とき (1 と 1 のとき) だけ出力が 1 になる。ここで、出力 1 は、「液体」である液滴が溶解する挙動として現れる。RNA 液滴の構成単位は分岐状の RNA ナノ構造体 (モチーフ) である。分岐の先端はヘアピン状になっていて、キッキング・ループ (KL) 相互作用を介してモチーフ同士が結合し、ネットワーク状の構造体を持ち、水に溶けにくい。入力が両方とも 1 のとき、モチーフは 2 つに分裂する。このサブ構造は水に溶けやすく、液滴は溶解する。

(b) モチーフの分離メカニズム。miRNA が 2 種類入力 (1 と 1) されたとき、モチーフが分離する。KL 相互作用を行うのは、分岐末端に位置する Xs1-Xs4 の配列であり、サイドにある 2 本の突起端 STH1、2 には、miRNA 配列中の同色部分と結合する配列がある。各 miRNA は、これを足がかりとして STH1、2 に結合し、もともと結合していたもう一方の RNA 鎖を切り離す。この鎖置換反応がモチーフの 2 箇所で行われる結果、モチーフは 2 つのサブ構造に分離する。

(c) モチーフの結合の様子。初期状態では KL の個数が 4 個あるが ($f=4$)、鎖置換反応の結果、一つの構造にある KL は 2 個に減る ($f=2$)。初期状態では全体がネットワーク状の構造であるが、反応後はくさり状の構造になる。

② RNA 液滴による AND 演算の実証

実際に AND 演算 RNA モチーフから液滴を作製して、さまざまな miRNA の入力に対する演算を実行した。今回は乳がんのバイオマーカーである 4 種類の miRNA (m1, m2, m3, m4) を用いた。まず、m1 および m2 に対する AND 演算を実行した (図 2)。入力に対して選択的に RNA 液滴が溶解するかを検証するため、片方だけの入力 ($[1, 0]$ および $[0, 1]$) ならびに両方とも入力しない場合 ($[0, 0]$) も検討した。入力 $[0, 0]$ ではバッファの他に、m1、m2 とは別の miRNA である m3 および m4 (図 2a) を入力とした (図 2b)。

まず、AND 演算 RNA モチーフが RNA 液滴を形成することを顕微鏡観察によって明らかにした (図 2d 左端)。次に、各入力の組み合わせ (図 2b) の結果生じる RNA 液滴の様子を観察した。入力 $[1, 1]$ のとき (図 2d 最上段)、25 分ほど経過するとほとんどの液滴は溶けて、最終的に見えなくなった。それ以外の入力では 3 時間半以上の観察を通じて液滴は溶解しなかった。

以上の観察結果から、研究目的とした「特定の miRNA が 2 種類入力されたときだけ、RNA 液滴が溶解する」という挙動は実現された。これにより、「バイオマーカーである miRNA を入力とした AND 演算を RNA 液滴が実行できる」ことが実証され、RNA に特有の相互作用でも液滴が形成でき、機能化できることも示された。

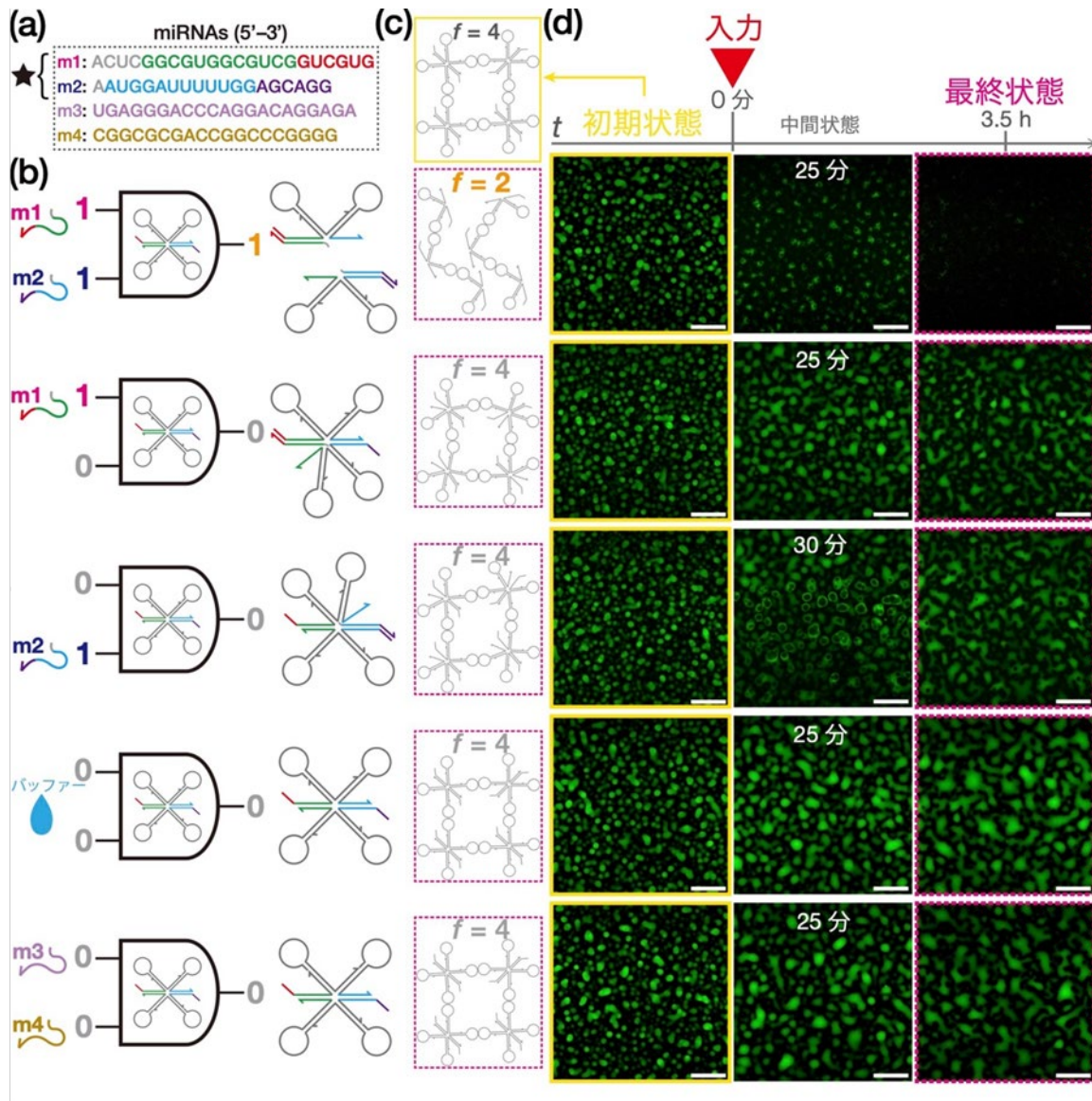


図2 RNA 液滴による AND 演算の実行。(a) 乳がんのバイオマーカーである4つの miRNA。上の2種類が今回の AND 演算でターゲットとした配列。m3、4 は非ターゲット配列。(b) 入力の各組み合わせおよび対応するモチーフの最終構造。入力[1, 1]のときだけモチーフが2つに分離する。(c) モチーフの結合態様。入力[1, 1]以外はすべてネットワーク状構造が保存される。(d) 各入力に応じた RNA 液滴の変化。入力[1, 1]のときだけ液滴が溶解する。スケールバーは 50 μm。

③ RNA 液滴による AND 演算の結果を目で検出する

これまでは、蛍光分子をマーカーとして高解像度でイメージングできる共焦点顕微鏡を使って微小な液滴を観察してきた。AND 演算 RNA 液滴のより幅広い応用を可能にするには、高価な材料や機器に依存しない検出手法が必要となる。そこで本研究ではさらに、RNA 液滴の演算結果をもっと簡便かつ安価に検出する手法を開発することにした(図3)。

先ほどと同じように RNA 液滴に各入力を与えた後、メチルグリーン・ピロニンと呼ばれる細胞染色液を加えた(図3a)。これは、小中学校の自由研究などでも使われるような安価な染色液で、RNA と DNA を異なる色で染めることができる。染色液を加えたサン

プルを遠心分離機で遠心させて、上澄み部分だけを新しいバッファーと交換した。m1 および m2 を両方とも加えた場合、RNA 液滴が溶解してなくなるため染色が見られなかった。それ以外の入力の場合、液滴は残っているため染色された RNA の沈殿物が直接目視できた(図 3b)。このように、RNA 液滴による AND 演算の出力結果を高価な機器や試薬に頼らないで検出することに成功した。

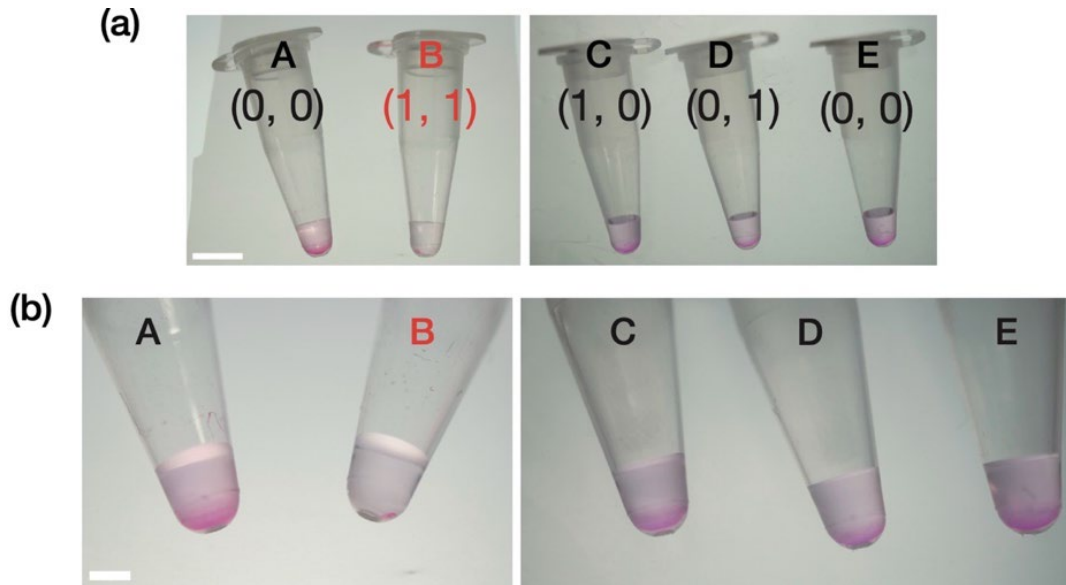


図 3 直接目視による AND 演算の検出。(a) チューブ内にある RNA 液滴に miRNA もしくはバッファーを入力後、メチルグリーン・ピロニン染色液を加えたあとの様子。【A、E】m1 および m2 ともに入力なし；【B】両方とも入力あり；【C、D】：片方だけ入力あり。(b) チューブ底の近接撮影。出力 = [1] のときは液滴が溶解するため、染色液では染まらない。一方、出力 = [0] のときは液滴が保存されているため、染色液でマゼンタ色に染まった RNA が目視できる。スケールバーは(a) 5 mm、(b) 2 mm。

●社会的インパクト

本研究成果をもとに、バイオマーカーである miRNA を検出するがん早期診断技術への活用が見込まれる。ターゲットに応じた配列設計が可能であるため、今回用いた乳がんのバイオマーカー miRNA 以外にも多種多様な RNA の検出も可能で、柔軟かつ汎用的な応用が期待される。また、今回は AND 演算という最もシンプルな論理演算のみを扱ったが、複数の論理演算を組み合わせたより高度な論理回路を組み込んだ RNA 液滴コンピュータへの展開が可能である。また、液滴の演算結果を直接目視で検出できる技術は、大掛かりな診断機器へのアクセスが限定されている僻地や発展途上国などでの病気、ウイルス感染診断の拡充につながる。

●今後の展開

今後の基礎研究の観点からは、インテリジェントな RNA 液滴ロボットを生体、生細胞、人工細胞といった環境中で転写によって発現させる技術への貢献が期待される。昨今のパンデミックで多くの人命を救ったメッセンジャー RNA ワクチンにそのコンセプトの片

鱗が見られる。メッセンジャーRNA ワクチンは、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質が抗体の認識部位となることを利用して、病原性のない当該タンパク質だけをコードした RNA を体内に注入する。そして、発現したタンパク質が異物として認識されて、抗体がこれを撃退するように学習する。すなわち、特定のタンパク質をコードした情報をユーザーに送り届けるだけで、注入された細胞の中で生来的に備わっている生物学的な機構を利用して必要なパーツや機能が組み立てられていく。このように、情報工学的なアプローチから生体分子を使って高度な情報処理システムすなわち化学的人工知能を構築する研究は今後ますます活発になることが予想される。本研究では合成された RNA から直接液滴を作製したが、将来的には液滴を構成するモチーフの配列をコードした DNA を鋳型として細胞に注入し、細胞の転写機構を利用して RNA 液滴を発現する技術への重要な足がかりが得られたといえる。

●付記

本研究成果は、MEXT/JSPS 科学研究費助成事業（JP20H00619、JP20H05935、JP24H00070、JP20H05701、JP22K14528）、Human Frontier Science Program (HFSP; RGP0016/2022-102)、Heisei Memorial Research Grants、学術振興会特別研究員奨励費（JP22J00940）の支援のもとで得られた成果である。

【参考文献】

- (1) 「DNA 液滴」の形成と制御に成功（東工大ニュース 2020 年 6 月 12 日）
<https://www.titech.ac.jp/news/2020/046905>
- (2) 液滴の分裂によって、がんの可能性の有無を示す「DNA 液滴コンピュータ」の開発に成功（東工大ニュース 2022 年 6 月 6 日）
<https://www.titech.ac.jp/news/2022/064179>

【用語説明】

- (1) **マイクロ RNA (miRNA)**：遺伝子の発現を抑制する作用を持つ 21-25 塩基程度の一本鎖 RNA のこと。近年の研究により、がんのバイオマーカーとしての可能性が示されている。DNA が遺伝子の書き込まれた設計図であるのに対して、RNA はタンパク質を実際に合成する際の指示書としての役割を持つ他に、遺伝子の発現の制御や細胞間の情報伝達などさまざまな機能を担っている。
- (2) **AND 演算**：論理演算の一種。“0”および“1”の 2 値（ビット）をもとにした AND 論理演算では、2 入力どちらも“1”のとき出力が“1”となり、少なくともどちらかが“0”のとき出力が“0”となる。論理積ともいう。
- (3) **液-液相分離**：水溶液中で、混和しやすい高分子同士が相互作用を通じて集合し、混和しにくい高分子同士が排斥し合うことで、流動性を持つ液体状の構造が分離すること。
- (4) **プログラマブルな生体分子**：核酸 (DNA、RNA) を構成する塩基のペアリングを

決める「塩基対形成ルール」を利用することで、核酸構造体の形状・機能・挙動を自在に構築することができる。このペアリングは、DNA の場合、アデニン (A) はチミン (T) と、グアニン (G) はシトシン (C) と塩基対を形成する。RNA の場合、T がウラシル (U) に置き換わる上に、G と U も緩く塩基対を形成することが知られている。

- (5) **転写:** DNA の塩基配列を鋳型として RNA ポリメラーゼという酵素により DNA と同じ配列を持つ RNA が合成される。ただし、T は U に置き換えられる。この RNA はメッセンジャーRNA と呼ばれ、タンパク質合成の指示書となる。
- (6) **鎖置換反応:** 二本鎖 RNA を使って説明する。片方の配列が、T-M というドメインで表されるとする。もう一方の RNA が M と相補的な m^* とすると、M および m^* の部分で二本鎖 M/ m^* を形成している。ここに最初の T-M 配列に相補的な 3 本目の RNA、すなわち t^*m^* が来るとする。T と t^* が相補的であるため 1 本目と結合する (T/ t^*)。この結合を足がかりとして、 m^* は M と結合して (T-M/ t^*m^*)、もともと M と結合していた m^* を切り離す。この反応は DNA でも起こる。

【論文情報】

掲載誌: *ACS Nano*

論文タイトル: Programmable Computational RNA Droplets Assembled via Kissing-Loop Interaction

著者: Hirotake Udono, Minzhi Fan, Yoko Saito, Hirohisa Ohno, Shin-ichiro M. Nomura, Yoshihiro Shimizu, Hirohide Saito, Masahiro Takinoue (鶴殿寛岳、范敏之、齊藤洋子、大野博久、野村 M.慎一郎、清水義宏、齊藤博英、瀧ノ上正浩)

DOI: 10.1021/acsnano.3c12161

【問い合わせ先】

東京工業大学 情報理工学院 情報工学系 教授

瀧ノ上 正浩

E-mail: takinoue@c.titech.ac.jp、 masahiro.takinoue@takinoue-lab.jp

TEL: 045-924-5680 (教員室・直通) / 045-924-5653 (秘書室) / 045-924-5208 (スタッフ室) FAX: 045-924-5206

【取材申込先】

東京工業大学 総務部 広報課

E-mail: media@jim.titech.ac.jp

TEL: 03-5734-2975 FAX: 03-5734-3661

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 国際広報室

E-mail: media@cira.kyoto-u.ac.jp

TEL: 075-366-7005

東北大学 大学院工学研究科 情報広報室
E-mail: eng-pr@grp.tohoku.ac.jp
TEL: 022-795-5898 FAX: 022-795-5898

理化学研究所 広報室 報道担当
Tel: 050-3495-0247
Email: ex-press [at] ml.riken.jp