

前田バイオ工学研究室 Bioengineering Laboratory

主任研究員 前田 瑞夫 (工博)
MAEDA, Mizuo (Ph.D)



キーセンテンス：

1. バイオ成分を融合した機能性ナノ材料を開発する
2. マイクロ・ナノテクノロジーを基盤とする分析システムを開発する
3. バイオ高分子が関与する生物学的プロセスを制御する

キーワード：

DNA 工学、マイクロ分析システム、分子シャペロン工学、生分解性高分子、半導体デバイス工学

研究概要

当研究室では、工学とバイオの新たな融合領域を開拓することを目的として研究を進めている。高分子化学、分析化学、界面化学、生化学、分子生物学などの学術領域を基礎に、バイオ成分を融合した新物質・新材料の創製、バイオ計測の新原理・新手法の開発、ならびに生命プロセスの人工的制御に関する研究を行い、バイオ材料学、環境科学、マイクロ・ナノサイエンス、生命科学、医用工学、その他の分野への応用を展開している。一例として DNA 機能材料に関する研究があり、独自に開発した DNA 複合高分子を、DNA バイオセンサ、アフィニティー電気泳動、SNPs 応答性ナノ粒子、遺伝子応答性ハイドロゲル、人工的遺伝子機能制御などへ展開することにより、DNA 工学という新しい境界領域を開拓しつつある。

1. DNA コンジュゲートの化学

(1) DNA 複合高分子の合成と応用 (前田、宝田、藤田、金山、Ooi、平峯)

高度な DNA 機能材料の開発を指向して新規 DNA 複合高分子の合成法を開発をしている。ポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) との共重合体は、相転移により PNIPAAm セグメントが凝集した疎水核に一本鎖 DNA が密生した高分子ミセル (機能性ナノ粒子) を自発的に形成する。本年度は、引き続き原子移動ラジカル重合 (ATRP) 法により分子量と分子骨格の明確な PNIPAAm-DNA 共重合体の精密合成を行い、その分子特性を活かした機能性ナノ粒子の開発を試みた。ATRP により、様々な鎖長の線状ならびにマルチアーム型の PNIPAAm を合成し、クリック反応によりその末端に DNA 鎖を付加させることで二成分ブロック共重合体の合成に成功した。相転移後のナノ粒子構造は DNA 成分が表層にきれいに揃ったコアシェル型であるが、PNIPAAm ブロック鎖長や DNA 鎖長に依存して分子凝集数や粒径を変えることを見出した。従来の共重合体に比べ、より高感度な DNA センサー材料としても期待できる。

(2) DNA ナノ粒子の非架橋凝集メカニズム (前田、宝田、藤田、金山、Ooi、小林)

表面に DNA を密生させたナノ粒子の分散安定性は DNA の末端塩基対構造に明敏に応答し、末端に一塩基の変異が存在すると高塩濃度下でも安定に分散したままであるが、完全相補鎖で二重鎖 (ds) を形成させると粒子は自発的に凝集する。この非架橋型の粒子凝集は疎水核の材質によらない。非架橋凝集した DNA 担持ナノ粒子の構造体を解析すると、粒子間距離は表面に担持した dsDNA の鎖長に依存し、凝集体は結晶様の秩序構造を形成する。その際、DNA 密生層が互いに重なり合いながら凝集構造を形成することがわかっている。長さの異なる二種類の DNA 両方を担持したナノ粒子を用い、長い方の DNA のみを二重鎖形成させても非架橋凝集を起こした。単一 dsDNA を担持したナノ粒子と比較すると、実効の dsDNA グラフト密度は低いため、粒子はさらに深く重なり合いながら凝集しうることが分かった。このグラフト密度の低下は、一方で、粒子の分散安定性を高めることを示唆する結果も得られた。DNA 鎖が揺らぐことのできる空間の増大により立体反発力が増大したとも考えられる。

(3) DNA ナノ粒子を用いる重金属イオンの目視検出 (前田、宝田、藤田、金山)

金ナノ粒子の分散状態に連動した色の変化を利用する、有害物質の目視検出法を開発を行っている。これまでに、水銀(II)イオン(Hg²⁺)に選択的に応答して赤→無色の明瞭な色変化を示すチミン-チミンミスマ

ッチ部位を有する DNA 二重鎖担持金ナノ粒子 (dsDNA-GNP) を開発し、試料内に含まれる Hg^{2+} の目視検出に成功している。本年度は、銀 (I) イオン (Ag^+) 検出を目指した dsDNA-GNP の開発を行った。シトシン-シトシン (C-C) ミスマッチ部位を自由末端近傍に導入した dsDNA-GNP は、1 M 以上の高塩濃度溶液でも安定に分散し赤色を示した。これに Ag^+ を添加すると、dsDNA-GNP が速やかに凝集し赤色から薄青色の明瞭な色の変化が見られた。この変化は、 Na^+ 、 Li^+ 、 Cs^+ などの他種の一価の金属イオン添加では起こらず Ag^+ 選択的なものであった。本システムでは、0.1 mg/mL 以上の Ag^+ を室温で迅速に (1 分程度) 目視検出できることが明らかとなった。

(4) 機能性表面を用いるリバーストランスフェクション法 (前田、宝田、水谷)

経済的かつ細胞毒性の低い遺伝子導入技術として、機能性表面を用いるリバーストランスフェクション法が注目されているが、実用にたえうる遺伝子導入効率が得られていないのが現状である。本研究は、リバーストランスフェクション法の遺伝子導入効率の上昇を目指して、外部刺激に応答してカチオン性高分子-DNA 複合体を培地中にリリースする機能性表面の開発を目的とする。本年度は、ピリジルジスルフィド基を導入したポリエチレンジアミン (PEI) と、シランカップリング反応によりチオール基を導入したガラス表面とを反応させて、PEI がジスルフィド結合を介して化学修飾された表面を調製した。この機能性表面は、システイン (Cys) とのジスルフィド交換反応をトリガーとして PEI と DNA の複合体をリリースすることが期待できる。まず、調製した表面に 293T 細胞が良好に接着し、細胞毒性を示さないことを確認した。さらに、293T 細胞に対して毒性を与えない 1 mM Cys 含有緩衝液への暴露によって PEI が表面からリリースされることを実証した。

(5) フォトクロミック塩基による機能性核酸の光制御 (前田、小笠原)

タンパク質が「いつ・どこで・どの程度の量」発現するかにより生命現象は成り立っている。単一細胞内においては、mRNA の局在化がタンパク質発現の時空間制御に寄与している。これを人工的に制御するためケージド化合物が用いられているが、ケージングの不可逆性により空間的及び発現量の制御性は極めて低いものであった。本課題では、新規光応答性核酸塩基「フォトクロミック塩基」を用い mRNA の翻訳を可逆的に光制御することで、単一細胞において mRNA の局在環境を疑似的に構築することを目指す。本年度は、フォトクロミック塩基をベースに合成した「フォトクロミック cap」により HeLa 細胞内で蛍光タンパク質の発現を制御することに成功した。

2. バイオ分析システムの開発

(1) キャピラリー電気泳動による遺伝子診断 (前田、宝田、金山、太田、塚田)

簡便かつ定量的な遺伝子分析法の開発をめざして、ポリエチレングリコールと一本鎖 DNA のジブロック共重合体 (PEG-*b*-DNA) をプローブに用いるアフィニティーキャピラリー電気泳動法を開発している。プローブと相補的なサンプル DNA は、泳動中にプローブと複合体を形成するため、非相補的なサンプル DNA よりも泳動速度が著しく減少することが分離原理である。本年度は、DNA 塩基配列と PEG 分子量が異なる 4 種類のプローブを同時にキャピラリーゾーン電気泳動で使用すると、混合物から 4 種類の標的 DNA を分離抽出できることを実証した。近年、がんに関連した異常な発現が明らかにされている血中の miRNA の同時多検体検出に応用することが期待できる。

(2) 細胞融合マイクロチップの開発 (前田、細川、和田、森崎)

再生医療に寄与する細胞材料を創成する、マイクロ流路による細胞融合法の開発を行っている。これまでに、細胞融合部を並列化して合計 32 対の細胞が同時に融合できるマイクロチップを開発してきた。本年度は、融合対を 1000 対程度に拡大することと、融合後に細胞を継続的に培養することを目的として、新しいマイクロ流路の開発に着手した。幅 5-7 μm のスリットを挟んで細胞を対合させるポケットを有したマイクロ流路を細胞培養基材上に構築したところ、ポケットによる細胞の捕捉と、それに引き続く細胞の伸展に成功した。今後は、このマイクロチップの形状、および実験条件の至適化を行い、効率的な細胞融合の実現を目指す。

(3) マイクロ RNA 高感度検出用マイクロチップ (前田、細川、新田、小松)

本研究では、がん早期診断への応用を目指し、自律駆動マイクロチップを利用したマイクロ RNA 高感度

検出の研究を行っている。これまで、PDMS マイクロ流路を用い、アミノ化ガラス基板にグルタルアルデヒドを介して一本鎖プローブ DNA を選択的に固定化する技術を確認している。本年度は、DNA において知られているスタッキング効果を利用し、狙った配列のマイクロ RNA をサンドイッチハイブリダイゼーションにより高感度で蛍光検出するプロトコルを確認した。その結果、検出限界 0.62 nM が得られ、検出に必要な時間を従来技術の十数時間から 20 分と大幅に短縮することができた。今後は本研究室オリジナルの技術である層流樹状増幅法により、迅速性を損なうことなく検出限界を大幅に改善する予定である。

(4) 希土類含有セラミックスを用いたバイオイメージングプローブ (前田、座古)

本研究では、近赤外 (NIR) 光を励起光としてさらに長波長の NIR 領域での蛍光を発する新規なバイオイメージングプローブを開発することを目的としている。これにより、生体深部の長時間イメージングが可能になると期待できる。これまでに Er^{3+} および Yb^{3+} を共ドーピングした Y_2O_3 ナノ粒子 ($\text{ErYb-Y}_2\text{O}_3$) による NIR 蛍光イメージングに成功している。今年度は粒子を用いた新たながん治療法を提案した。ここでは大腸がん治療で近年多く用いられている腹腔鏡手術において、本粒子を用いたマーキングを行う。これにより適切な切除範囲が設定できることが期待できる。今年度はブタ大腸の内壁に注入した粒子溶液を腸外からの NIR 蛍光イメージングにより観察することに成功した。今後はモデル動物などへの応用を検討する。

(5) ナノポアを用いる単分子糖鎖シークエンサー (前田、藤田、武政)

薄膜に直径数 nm の穴を 1 つ開けた「ナノポア」は、分子径とサイズが近いために、ポアに 1 分子が通過する際の各種変化を高速かつ高精度に検出可能であり、新世代の解析ツールとして注目されている。ナノポアを有する膜を電解質水溶液に浸して膜の両側に電圧を印加すると、ナノポアを通過したイオンの移動による一定電流が観測される。粒子がナノポアを通過する際に、ポアの実効断面積が減少するために電流は減少し、電流の時間変化はパルス状に変化する。分子の通過時間に依存するパルス長と、分子の断面積を反映するパルスの振幅を精密測定することで、1 分子観察が可能となる。本イオン電流計測により、多糖類や糖たんぱく質をはじめとする糖鎖高分子の 1 分子検出を行い、分子の局所的な折り畳み構造や一部の分岐構造といった、1 分子内の構造を得た。また、速度制御のために、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) をナノポア通過イオン電流測定と組み合わせる装置系を構築した。今後標準物質を用いた計測精度の確認に加えて、SPM を用いた測定で高精度化を目指す。

(6) メッセンジャーおよびマイクロ RNA の高感度迅速検出法 (前田、平野)

近年、生体内に存在する各種核酸、とりわけメッセンジャー RNA (mRNA) やマイクロ RNA (miRNA) の遺伝子発現制御に関する新たな役割や機構が明らかになりつつあり、それらの量的変動と疾病との相関に大きな関心が集まっている。本研究では核酸マイクロアレイを基本的なプラットフォームとして、各種 RNA の迅速・高感度・網羅的な検出法の開発に取り組んでいる。高感度化手法の一つとして、蛍光物質の集積化による感度向上を着想した。集積化のための母剤として蛍光物質を導入可能な反応性官能基を有するポリマーを用いることとし、今年度は目的とするポリマーの合成条件の検討を行った。

(7) マイクロ流路中の微生物に対する光フィードバック (前田、尾笹)

生物系の時間発展システムに物理的なフィードバックを与える複合システムを構築し、「潜在的に方向性をもった時間発展揺らぎ」を研究すべく、本年度は光-微生物フィードバックについて動的制御・ニューロコンピューティング・長期培養の 3 項目を研究した。

微生物ユーグレナ (和名、ミドリムシ) の密度や分布を光フィードバックで制御する実験を 3 種類のフィードバックアルゴリズムを用いて行った。密度制御においては仮想的なエリアへのリレーフィードバック制御と区分化エリアへの照射光強度の比例制御を試み、リレー制御ではオーバーシュートが大きくなりすぎるものの、光強度の比例制御はうまく働くことを明らかにした。また、区分化エリアへ逐次パターン照射によって特定のエリアへのセルを集合させることができ、光感受性の差によってセル分離が実現できることを示せた。

微生物ユーグレナを媒介としたニューロコンピューティングを 4 都市巡回問題をターゲットにして検証し、最適解に到達できること、および複数の最適解の間の遷移が起こることを実証した。ユーグレナの光反応が単純なノイズオシレータとは違い、光照射エリアのセル密度が時間とともに徐々に減少すること、それが長期安定性につながることを示した。解の分布の偏りはプロジェクターから照射している 2 次元パ

ターン光の偏光依存である可能性が高いと推測できた。

PDMS 製の閉鎖マイクロ流路において問題となる水分蒸発を防ぐため、カバーガラスによるサンドイッチ構造とスペースを水で満たす方を考案し、2週間以上の長期培養を可能とした。長期培養においてユーグレナの活動度はサーカディアンリズムを示した。2つの独立した培養系の間人工的なフィードバックによって相互作用をもたらすためには、光照射を制御する2台のコンピュータ間でデータ交換を行えばよいことがわかった。

3. バイオ高分子の科学

(1) 分子シャペロンのタンパク質のアミロイド凝集への関連 (前田、座古、Sörgjerd、吉田)

本研究では、分子シャペロンがタンパク質のアミロイド線維凝集形成に与える影響を明らかにすることを目的としている。分子シャペロンタンパク質は他のタンパク質の高次構造形成を介助すると考えられている。一方、タンパク質はミスフォールディングの結果、アミロイド線維形成する場合があります、疾患の原因となるとされている。これまでに我々は分子シャペロンの1種であるプレフォルディングが、アルツハイマー病の原因タンパク質とされているアミロイド β やハンチントン病の原因とされているポリグルタミンタンパク質の線維形成に関与していることを発見した。特に、ポリグルタミンにおいては2~4量体の比較的低分子量の重合状態に留め、無毒化していることを見出した。現在は他の分子シャペロンの関与の有無についての検討を進めている。

(2) インスリンアミロイドの物性 (前田、座古)

本研究では、ホルモンペプチドであるインスリンのアミロイド線維形成に着目している。これまでに我々はインスリンが還元剤存在下で柔軟で細く、細胞毒性が非常に低い糸様線維を形成することを見出した。さらに他の糸様線維を形成するタンパク質についても検討を進め、その細胞毒性が同様に低いことを見出した。線維の細胞への結合を評価したところ、糸様線維は剛直な線維に比べて細胞への吸着が少なく、細胞への結合性と毒性に相関があることが示唆された。現在はさらに詳細に毒性メカニズムを調べている。

(3) 分子進化学によるバイオポリエステル分解酵素の高性能化 (前田、平石、宮宇地、Tan、位田)

近年、地球温暖化などの環境問題の解決策の一つとして、二酸化炭素排出を低減するバイオポリエステルが注目されている。さらに資源有効利用の観点から、使用済みバイオポリエステルの積極的リサイクルが重要視されており、特に廃バイオポリエステルを「高度にモノマー基質が濃縮された原料」として扱うケミカルリサイクル技術の開発が望まれている。本研究では、従来のバイオポリエステルのケミカルリサイクル技術開発において軽視されがちであった「分解」のプロセスを強化することを目的として、高選択・低副産物・高効率・低温で反応可能なバイオの利点を生かしつつ、さらに一歩進んで「分解酵素」の人工進化による高性能化を実施する。本年度は、昨年度得られたバイオポリエステル分解酵素の第1世代の変異酵素群をベースにDNAの再構築を行い、第二世代の変異酵素ライブラリーを作製した。次いで、水溶性基質の分解活性を指標としてスクリーニングを行った。その結果、野生型に比べ4から8倍程度に分解活性が向上しているものが数クローン得られた。今後これらの解析を行い高活性化の要素因子を解明して、本酵素の更なる活性向上を目指す。

(4) バイオ医薬運搬のための逆相ポリマーミセル (前田、宝田、小屋松)

タンパク質や核酸といったバイオ医薬品は高い薬理効果を有するものの、その吸収性の低さや血中半減期の短さから注射による頻回投与を余儀なくされている。そこで、我々はこれらの弱点を克服するための新規ドラッグ・デリバリー・システムの開発に取り組んでいる。これまでに、粒子径が100~200 nm程度で非常に高い薬物封入率を示す逆相ポリマーミセル型ナノ微粒子の創出に成功している。本年度は本微粒子がpHに応答して内包薬物を放出できることを発見した。また、粒子に機能性分子を修飾することで細胞への取り込みを促進することができ、粒子の高機能化を達成することができた。今後更なる検討を進め本微粒子の有用性を示していく。

Key Sentence :

1. Develop functional bioconjugated nanomaterials

2. Develop micro/nanotechnology-based bioanalytical systems
3. Regulate biochemical reactions and biophysical processes

Key Word :

DNA engineering, micro-analytical system, molecular chaperone engineering, biodegradable polymer, semiconductor device technology

Outline

The principal purpose of our laboratory is to explore a new frontier of research field which fuses engineering and biological science. On the basis of polymer chemistry, analytical chemistry, surface chemistry, biochemistry and molecular biology, we are studying on new materials comprising biological components, novel methodology for bioanalysis and medical diagnosis, and artificial systems for regulation of biological processes. Those new ideas and materials are being applied to the field of biomaterials science, environmental science, micro/nanoscience, life science and medical engineering. For example, we newly prepared DNA-vinyl polymer conjugates which have been applied for DNA biosensor, affinity electrophoresis, SNPs-responsive diagnostic nanoparticle, gene-responsive hydrogel, artificial gene regulation system, etc. These researches may be classified into a new category, i.e., "DNA engineering".

1. DNA Conjugate Chemistry

(1) Synthesis of DNA-polymer conjugates and its applications (Maeda, Takarada, Fujita, Kanayama, Ooi, Hiramine)

Single-stranded (ss) DNA-carrying polymer micelles are novel functional materials for the sequence-specific gene sensing and separation. To develop novel gene sensors and sensing methods, it is essential to prepare the novel DNA-polymer conjugates with controllable and well-defined architectures via precise synthesis. Linear and miktoarm star-shaped diblock copolymers consisting of ssDNA and poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) with various compositions were synthesized via atom transfer radical polymerization and click chemistry. The temperature-responsive phase transition of the DNA-conjugated copolymers was examined. The lower critical solution temperature decreased and its enthalpy increased with increasing PNIPAAm content. The copolymers self-assembled into well-defined nanoparticles having a core composed of PNIPAAm and a coronal layer of DNA above LCST in aqueous solution. The particle size and the micellar aggregation number of copolymer chains depended on the macromolecular composition and chain architecture. But the surface area occupied by one DNA block almost unchanged, independent of their factors. The aggregation number of miktoarm star copolymer was lower than that of linear analogue, resulting in the formation of smaller particle composed of a fairly high core density.

(2) Non-crosslinking aggregation mechanism of DNA-linked nanoparticle (Maeda, Takarada, Fujita, Kanayama, Ooi, Kobayashi)

When ssDNA on a nanoparticle hybridizes with its complementary DNA, the resulting double-stranded (ds) DNA-functionalized nanoparticles aggregate promptly above a salt concentration. We have studied this non-crosslinking aggregation phenomenon mainly using a solution small-angle X-ray scattering. In the aggregation, the inter-surface distance increases with dsDNA length. The nanoparticles aggregates while the DNA coronal layers overlap to some degree each other. Using a nanoparticle with two different length dsDNA, the effect of dsDNA graft density on the non-crosslinking aggregation was examined. The reduction in graft density of dsDNA was found to cause the overlap of nanoparticle to be deeper. Surprisingly, the nanoparticles covered loosely with dsDNA showed a higher colloidal stability. This might be because of the entropic gain accompanied by the increase of space available for dsDNA to move.

(3) Naked-eye detection of toxic heavy metal ions using DNA nanoparticles (Maeda, Takarada, Fujita, Kanayama)

We have been developing the DNA nanoparticle-based sensing system for the naked-eye detection of

the toxic heavy metal ions. We have already succeeded in the development of the naked-eye detection system for mercury (II) ion (Hg^{2+}), which is based on the non-crosslinking aggregation of the double-stranded DNA carrying gold nanoparticles with thymine–thymine (T–T) mismatch site (dsDNA-GNP) induced by the formation of T– Hg^{2+} –T complex. In this year, we adopted this system for the silver ion (Ag^+) sensing. The dsDNA-GNP containing a single cytosine–cytosine (C–C) mismatch site adjacent to the distal end was developed as a detection probe for Ag^+ in aqueous solutions. The particles dispersed into aqueous medium even at the high salt concentration (above 1 M); the dispersion showed a red color. On the contrary, in the presence of Ag^+ , the particles rapidly aggregated in a non-crosslinking manner due to the formation of C– Ag^+ –C complex, leading to a distinct color change from red to colorless. The Ag^+ -triggered colloidal stability change of the dsDNA-GNP showed high selectivity over other monovalent metal ions.

(4) Reverse transfection using smart surface (Maeda, Takarada, Mizutani)

Recently, reverse transfection method has a lot of attention because of its economic efficiency and low cytotoxicity. However, the transfection efficiency achieved by using the existing materials is still low for practical use. In this study, we aim to develop novel surfaces releasing polycation-DNA complexes in a stimuli-responsive manner in order to achieve the high transfection efficiency. In this fiscal year, pyridyl disulfide-modified polyethylenimine (PEI) and thiol-modified glass surface were conjugated to obtain PEI-grafted surface via disulfide bonds. The functional surface thus obtained had no toxicity to 293T cells. Moreover, PEI was successfully released from the surface by applying the buffer solution containing 1 mM cysteine, which was also nontoxic to 293T cells.

(5) Photoregulation of functional nucleic acids by photochromic nucleobase (Maeda, Ogasawara)

Living processes are managed through the precise control of “when, where, and how long” proteins are expressed. 10 years ago, the mRNA caging system that used a caging compound was reported. However, this system allowed for only a single off-to-on regulation event because the uncaged mRNA could not be re-caged. This problem prohibited control over the magnitude and period of protein expression. In the present study, we will develop the reversible photoregulation method for translation and create the quasi-localization of mRNA in a single living cell by using photochromic nucleobase. We succeeded in the photoregulation of protein expression in a HeLa cell by using the *cis-trans* photoisomerization of the photochromic 5'-cap.

2. Bioanalytical Systems Engineering

(1) Gene mutation assay by capillary electrophoresis (Maeda, Takarada, Kanayama, Ohta, Tsukada)

Towards facile and quantitative gene analyses, we have been developing an affinity capillary electrophoresis using a polyethylene glycol-DNA diblock copolymer (PEG-*b*-DNA) as an affinity probe. The existence of target genes in DNA samples is confirmed by observing the distinct peak on the electropherogram, because the target single-stranded DNA (ssDNA), which is complementary to PEG-*b*-DNA, migrates more slowly than nontarget ssDNA due to the complex formation. In this fiscal year, we demonstrated that a mixture of four kinds of target ssDNA was clearly separated by affinity capillary zone electrophoresis using four types of PEG-*b*-DNA probes with different DNA sequences and PEG lengths. This method will be utilized for detecting multiple microRNAs in blood serum, whose abnormal expression was recently proven to be associated with cancer.

(2) Microchip for cell pairing and fusion (Maeda, Hosokawa, Wada, Morisaki)

We have been developing a cell fusion method utilizing microstructures to provide a cellular source for regenerative medicine. We had already developed a microfluidic system which has 32-plex cell fusion microstructures. This year, we started to develop a microfluidic system which performs approximately 1000 cell fusions followed by cell culture. The microfluidic system was constructed on cell culture dish and had cell-traps separated by 5-7 μm -wide slits. Using this system, we succeeded in trapping single cells followed by cell spreading on the culture dish. We will optimize the geometry of the pairing channels and other conditions for this microfluidic system to realize highly efficient cell fusion and cell

culture.

(3) Highly sensitive detection of microRNAs on a microchip (Maeda, Hosokawa, Arata, Komatsu)

Towards early-stage cancer diagnosis, we have been working on highly sensitive microRNA detection with a power-free microchip. We had already established a protocol to make probe DNA patterns on an aminated glass substrate. This year, we have developed a protocol to detect target microRNA by sandwich hybridization with high sensitivity utilizing coaxial-stacking effect. As a result, limit of detection (LOD) of 0.62 nM was achieved and total detection time was drastically improved from more than 10 hours in conventional technique to 20 minutes. The next step in our project is to apply laminar flow dendritic amplification (LFDA) technique to improve LOD without compromising rapidity of total detection time.

(4) NIR nano-phosphors for bio-imaging (Maeda, Zako)

Near infrared (NIR) light in the wavelength region between 800 and 2000 nm is very useful for bio-imaging due to minimal optical loss. Rare-earth doped ceramics are known to emit efficient fluorescence in the NIR wavelength region. We have successfully demonstrated that Yb and Er-doped yttrium oxide nanoparticles (Y₂O₃:YbEr-NP) showed NIR emission under NIR excitation. Novel cancer surgery system using NIR nano-phosphors is now investigated. We demonstrated that NIR imaging of Y₂O₃:YbEr-NP through swine colon is possible.

(5) Single molecular sequencer for polysaccharides using a nanopore (Maeda, Fujita, Takemasa)

Nanopore, a few nano-meter hole in thin membrane, can be used as a tool for ultra fast detection of single molecules. Using a field-emission transmission electron microscope, the nanopore ranging from 1.5 to 50 nm was fabricated on a freestanding thin SiN membrane (thickness = 30 nm) using low pressure chemical vapor deposition (LPCVD). Based on the Coulter principle, cross-sectional area at each position can be estimated along polymer axis of individual molecule, and internal structures of single molecule, such as local folding structure and branch structure were investigated in the single molecular level for polysaccharides and glycoproteins. For the control of the translocation speed of the molecule, combined setup of scanning probe microscope and nanopore current measurement was built, and now we are investigating the branch structure of glycans, with this technique.

(6) A facile method for rapid and high-sensitive messenger/microRNA detection (Maeda, Hirano)

Recent advances of molecular biology uncover novel roles of nucleic acids, in particular messenger/microRNA, for gene expression regulation. Relationship between quantitative variation of these RNAs and diseases are of interest for molecular diagnosis. In this work, we have investigated a facile method for rapid and highly-sensitive detection of the RNAs based on microarray techniques. Accumulation of fluorescent probes is one of the effective methods for highly-sensitive detection. In this year, to obtain suitable materials for accumulation, we have designed and synthesized novel polymer materials having reactive groups on its side-chains.

(7) Optical feedback to microbes confined in microaquariums (Maeda, Ozasa)

We examined two-dimensional (2D) optical feedback control of phototaxis flagellate *Euglena* confined in closed-type microfluidics, and demonstrated that the 2D optical feedback enables us to control the density/position of *Euglena* cells in microfluidics externally, flexibly, and dynamically. With three types of feedback algorithms, the density of *Euglena* cells at a specified area can be controlled arbitrary and dynamically, and more than 70% of the cells can be concentrated into a specified area. Moreover, *Euglena*-based neuro-computing has been achieved, where 16 imaginary neurons were defined as *Euglena* activity levels in 16 individual areas in microfluidics. The study has proven that the 2D optical feedback control of photoreactive flagellate microbes is a promising technique for microbial biology studies as well as various applications such as microbe-based particle transportation in microfluidics or separation of photosensitive/insensitive microbes.

3. Biomacromolecular Science

(1) Amyloid formation and molecular chaperone (Maeda, Zako, Sörgjerd, Yoshida)

Recent evidences have shown that many newly synthesized proteins require molecular chaperone proteins to reach their native state efficiently. On the other hand, misfolded proteins could aggregate into fibrils that cause various diseases. Amyloid β peptide (A β) forms typical amyloid fibrils and is known to cause Alzheimer's disease (AD). We have found that molecular chaperone prefoldin from eukaryote induces a formation of soluble A β oligomer and polyglutamine protein which causes Huntington disease. We have also found that prefoldin can inhibit aggregation polyglutamine at from dimer to tetramer. Now we are investigating the other chaperones on aggregation of these disease-related proteins.

(2) Structure and toxicity of insulin amyloid (Maeda, Zako)

Insulin is a small protein hormone and known to form amyloid fibrils under destabilizing conditions. We have found that insulin forms thin and flexible filaments in a presence of a reducing agent, tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP). Cell toxicity of the novel insulin filaments was much lower than that of insulin fibrils. We also found that cell binding of filamentous amyloids is weaker than that of fibrillar amyloids, which would be related with amyloid toxicity. Now we are investigating the origin of different affinities between these filamentous and fibrillar amyloids.

(3) Improvement of polyester-degrading enzyme by directed evolution (Maeda, Hiraishi, Miyauchi, Tan, Inden)

Biomass polymers have attracted interests as ecofriendly materials with the intent of solving problems such as a global warming that is characterized by a marked increase of atmospheric CO₂ level as well as depletion of the resources. From viewpoint of effective use of resources, the development on chemical recycle of biomass polymers is urgently desired. Enzymatic decomposition of the polymers is most important as a first step in their recycling. However, there has been no effective recycling system for them because of no enzyme having high-degrading activity. In this research, to improve the recycling system of the biomass polymers, evolutionary molecular engineering will be applied to key enzyme such as PHB depolymerase (PhaZ_{RpIT1}). This new approach consists of [1] random or DNA-recombination mutagenesis and high-throughput screening of evolved enzymes with altered properties, and [2] functional analysis of the enzymes. This year, we carried out DNA-recombination of the evolved PhaZ_{RpIT1} in the first generation and screened the more evolved enzymes using cell surface display system. On the basis of *p*-nitrophenylbutyrate hydrolyzing activity, we successfully obtained several clones with 4- to 8-fold higher activity than the wild type. In near future, we will perform the expression, purification and characterization of the improved mutant enzymes to reveal the cause of their activity elevation.

(4) Reverse polymer micelles for delivery of biopharmaceuticals (Maeda, Takarada, Koyamatsu)

Biopharmaceuticals such as proteins and nucleic acids have high therapeutic efficacy. However, they are inferior to chemical drugs in stability and absorption. Therefore, many of them need to be injected many times. To overcome this problem, we have been developing new drug delivery systems based on reverse micelles made of amphiphilic copolymers. We have already succeeded in preparing reverse polymer micelle-type nanoparticles with a diameter of 100-200 nm. In this fiscal year, we found that these nanoparticles released encapsulated molecules in a pH-dependent manner. In addition, we have also succeeded in transporting these nanoparticles into the cells by modifying the particle's surface with functional molecules. We will evaluate the performance of these nanoparticles as a drug carrier in the future study.

Principal Investigator

前田 瑞夫 Mizuo Maeda

吉田 知識 Tomonori Yoshida

Research Staff

細川 和生 Kazuo Hosokawa

平石 知裕 Tomohiro Hiraishi

宝田 徹 Tohru Takarada

座古 保 Tamotsu Zako

尾笹 一成 Kazunari Ozasa

藤田 雅弘 Masahiro Fujita

武政 誠 Makoto Takemasa

水谷 文 Aya Mizutani

Karin Sörgjerd

韓 愛善 Aishan Han

金山 直樹 Naoki Kanayama

和田 健一 Ken-Ichi Wada

寺田 尚史 Naofumi Terada

新田 英之 Hideyuki Arata

小屋松 祐一 Yuichi Koyamatsu

平野 覚浩 Akihiro Hirano

Assistant and Part-timer

横尾 淑代 Hideyo Yokoo

古本 真澄 Masumi Furumoto

Visiting Members

小笠原 慎治 Shinji Ogasawara

李 鎬翌 Hoik Lee

Sudesh Kumar

谷井 孝至 Takashi Tanii

岩田 忠久 Tadahisa Iwata

伊原 正喜 Masaki Ihara

佐々木 直樹 Naoki Sasaki

潘 鵬举 Pengju Pan

Technical Staff

宫宇地 裕美 Hiromi Miyauchi

Students

Wei Yang Ooi

Liu Tzea Tan

Tong Bu

臼田 雪子 Yukiko Usuda

太田 佑 Yu Ohta

小林 奈央 Nao Kobayashi

小松 仁 Hiroshi Komatsu

塚田 暖美 Harumi Tsukada

森崎 良 Ryo Morisaki

位田 雄祐 Yusuke Inden

平峯 勇人 Hayato Hiramine