

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 ナノ粒子の合成と物性評価 (前田、藤田、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の開発と物性評価を行なっている。ポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) との共重合体は、水溶液中で相転移により複数の分子鎖が集まってナノメートルオーダーの粒子を形成する。本年度は、引き続き原子移動ラジカル重合 (ATRP) 法とクリックケミストリーによるカップリング反応により、分子量と分子骨格 (線状やマルチアーム型) の明確な PNIPAAm-*block*-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。相転移により PNIPAAm ブロックが寄り集まって凝集することで疎水核を形成し、その表層に DNA が密生したコアシェル型のナノ粒子を形成した。粒子を形成する分子鎖の数 (会合数) や粒径は PNIPAAm ブロック鎖長や DNA 鎖長、分子骨格に依存した。このナノ粒子の DNA 鎖と完全に相補的な DNA と二重鎖 (ds) を形成させると、粒子は自発的に凝集するが、末端に一塩基の変異のある相補鎖と二重鎖形成させても安定に分散したままであり、ナノ粒子の分散安定性が DNA の末端塩基対構造に明敏に反応することを確認した。分子骨格は粒子密度を制御する因子であることを見出し、DNA 二重鎖形成に反応する粒子の分散安定性がその密度に強く依存することを実証した。高性能な SNPs 応答性ナノ粒子としての利用が期待される。

(2) DNA 担持ナノ粒子がつくるクロマチン様動的構造体 (前田、宝田、秋山、鹿川)

本研究は、規則構造を外部刺激で動的に制御できるナノ材料の創製を目的としている。具体的には、一本鎖 DNA の鋳型に DNA 担持金ナノ粒子を等間隔に配置した 1 次元ナノ構造体をつくり、イオン強度変化によってロッド状構造への変換をめざす。本年度は、200 塩基の鋳型 DNA に粒径 5 nm の金ナノ粒子を 3 つ配置したナノ構造体を構築した。まず、鋳型 DNA と相補的な一本鎖 DNA (35 塩基) を粒子表面に 1 つ固定し、さらに 16 塩基の一本鎖 DNA を高密度に固定した金ナノ粒子を調製した。このナノ粒子の分散液に鋳型 DNA を添加すると、糸ビーズ状のナノ構造体が自発的かつ効率的に生成することがゲル電気泳動、DLS 測定、TEM 観察で確認された。今後は、相補的な 16 塩基の一本鎖 DNA と塩を添加してロッド状構造へ変換することを試みる予定である。

(3) ナノ粒子上の DNA 二重鎖末端の揺らぎに着目した論理素子モデルの開発 (前田、金山、宝田)

DNA や RNA の多様な分子認識や触媒機能を利用した分子デバイスの開発に注目が集まっている。本研究では、溶液中の DNA 二重鎖に一般的にみられる局所的な構造の揺らぎ（ブリージング）に着目した論理素子モデルの設計に取り組んだ。最近、我々はナノ粒子表層の T-T ミスマッチ塩基が、分散媒に添加した Hg²⁺をとりこんで 2 : 1 錯体を形成すると、ナノ粒子の分散安定性が大きく低下することを明らかにしている。これは、ミスマッチ部位での擬似的な塩基対合が DNA 二重鎖末端のブリージングを抑制し、粒子間のエントロピー斥力を弱めることに起因する。以上の知見をもとに、C-C ミスマッチ塩基と錯体形成する Ag⁺と、上記の Hg²⁺の二種類の化学シグナル（入力）の組み合わせに対し選択的に凝集応答し、表面プラズモン共鳴シフトに起因する可視情報（出力）を与える二項演算型（AND および OR）の論理素子モデルを設計し、動作を実証することに成功した。

(4) DNA ナノ粒子の非架橋凝集の高感度検出（前田、座古、Tong）

本研究では、遺伝子の一塩基変異を高感度に検出することを目指して、DNA 担持ナノ粒子の非架橋凝集の検出法を開発している。DNA 担持ナノ粒子のコロイド分散安定性が二本鎖 DNA 末端の塩基対構造に強く依存していることを利用し、凝集の初期過程を検出することで少量の DNA でも検出可能な手法の開発を目指す。これまでに DNA 担持金ナノ粒子の 1 粒子解析に成功しており、今年度は 1pM 以下の DNA 添加による凝集の検出が可能であることを示した。今後はさらなる検出限界の改善を目指す。

(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）

細胞機能はタンパク質が「いつ・どこで・どのように」発現するかにより制御されている。本研究では、cis-trans 光異性化する核酸塩基「フォトクロミック塩基」を用い mRNA からタンパク質への翻訳を可逆的に光制御する方法を開発し、細胞機能を光で操作することを目指す。これまで、mRNA の 5'末端にフォトクロミック塩基を導入し、その異性化反応で翻訳を制御する方法を確立した。本年度は翻訳の光制御技術を用いて神経細胞の突起伸長関連タンパク質（Ras）の発現を操作することで、狙った神経細胞のみから神経突起を伸長させることに成功した。

2. バイオ分析システムの開発

(1) DNA 担持金ナノ粒子を用いる SNP 精密タイピング法の開発（前田、宝田、秋山、鹿川）

DNA を高密度に固定した金ナノ粒子は、同鎖長の相補鎖を系に添加して表面の DNA を二重鎖にすると、高イオン強度条件で自発的に凝集する（非架橋型凝集）。一方、わずかに一塩基が分散媒側に突出すると、粒子は著しく高いコロイド安定性を獲得する。金ナノ粒子が凝集して表面プラズモン共鳴シフトがおきると、分散液の色が赤色から青色に変化するので、一塩基の鎖長の違いを目視で判定することができる。本研究では、ジデオキシ鎖終結法（サンガー法）で一塩基伸長されたオリゴ核酸をサンプルに用いて、この特異現象に基づく SNP 精密タイピング法を開発している。測定対象には、さまざまな薬剤の副作用に関連するシトクロム P450 2C19 の遺伝子（CYP2C19*2）を選択した。本年度は、化学合成したオリゴ核酸をモデル検体に使って凝集の反応条件を最適化した。その結果、一塩基伸長の反応率が 30%でも目視識別できる測定系をつくることに成功した。

(2) 細胞融合マイクロチップの開発（前田、細川、和田、近藤）

再生医療に寄与する細胞材料を創成するマイクロ流路を用いた新規細胞融合法の開発を行っている。昨年度までに、マルチアレイ化した細胞対合ユニットを有するマイクロ流路を用いた細胞対合の構築とその後の培養に成功した。この成果を基に、本年度はマイクロスリットを介した細胞融合（スリット融合）の誘発に着手した。マイクロ流路構造と細胞融合誘発方法の改良を行うことで、スリット融合、およびスリット融合成立過程の詳細な観察に成功した。その結果、1) スリット融合では融合細胞間の核の混合が回避され、2) スリット融合成立後にお互いの細胞が解離して個々の独立した細胞へ復帰しうることを明らかにした。これらの結果から、このマイクロ流路を用いた新規細胞融合法は、細胞の初期化、および分化転換を誘発する新しい方法としての応用が期待される。

(3) マイクロ RNA 高感度検出用マイクロチップ（前田、細川、石原、長谷川）

本研究では、がんの早期診断への応用を目指し、バイオマーカーであるマイクロ RNA を、自律駆動マイ

クロチップを利用して高感度検出する研究を行っている。これまで、DNAにおいて知られているスタッキング効果を利用して、狙った配列のマイクロ RNA(miR-21-5p)をサンドイッチハイブリダイゼーションによって蛍光検出するプロトコルを確立した。その結果、検出限界 0.6 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 分へと大幅に短縮することができた。今年度は、本研究室オリジナルの技術であるシグナルの層流樹状増幅法を本系に適用することにより、迅速性を損なうことなく検出限界を 0.5 pM にまで改善することに成功した。さらに、さまざまながんの診断へ対応するために、本手法が他の配列(miR-500a-3p)にも適用可能であることを実証した。今後は、さらなる検出限界の改善および生体サンプルへの適用を予定している。

(4) マイクロチップ免疫アッセイによるバイオマーカーの高感度検出 (前田、細川、Lee)

人間の体液、たとえば血液や尿から微量のバイオマーカータンパク質を検出する手段として、マイクロチップを用いた免疫アッセイによる方法を開発している。今年度は基板上に固定化する抗体の濃縮効果について検討を行った。抗体の表面固定化密度を上げることによって、サンドイッチ免疫アッセイにおける信号強度を増強する効果が期待できる。エポキシ基で修飾したガラス基板上に、抗体溶液を滴下して抗体を固定化した。さらにその上に 27 個の貫通穴を持った PDMS 基板を接合してマイクロチップを作製した。モデル抗原として前立腺がんのマーカーとして知られる PSA (前立腺特異抗原) を選び、免疫アッセイを行ったところ、検出限界として 1 - 10 pg/mL、ダイナミックレンジとして pg/mL - μg/mL が得られ、既存の ELISA より大幅な改善が見られた。27 試料の同時免疫アッセイに要する時間は 4 - 5 h であった。今後は実試料への適用やさらなる自動化・並列化などを検討してゆく予定である。

(5) 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、吉本)

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 Er³⁺および Yb³⁺を共ドープした Y₂O₃ ナノ粒子 (ErYb-Y₂O₃) による NIR 蛍光イメージングに成功した。さらに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。今年度はブタを対象としたモデル手術を行い、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。

(6) 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」を利用して生体高分子の 1 分子内断面積の連続評価法開発に取り組んでいる。これまで取り組んできた糖鎖以外にも対象分子を広げ、また測定精度を向上させるため、標準物質として利用可能な分子の探索を行い、比較的安定した測定が可能な物質と条件を探し候補を絞った。電荷をもたない中性の分子に対しても化学修飾により電荷を導入する事でナノポアでの分析を可能にし、対象分子を拡大する事ができた。DNA コンジュゲートについても、ナノポアによる 1 分子検出が可能である事を確認し、分子径や電荷などの特徴から DNA 関連の分子種等を見分ける分析手法の開発に取り組んでいる。

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。今年度は、その他に分子シャペロンの 1 種である small heat shock protein (sHsp) のアミロイド β 凝集の毒性低下に関与することを見いだした。酵母由来の sHsp を用いてアミロイド β 凝集への影響を調べたところ、室温では凝集抑制することで、高温ストレス環境下では低毒性アミロイドを生成することで毒性軽減していることを示した。現在は他の生物種の sHsp を

用いた検討を進めている。

(2) インスリンアミロイドの物性 (前田、座古、Sörgjerd)

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。Luminescent conjugated polythiophene (LCP)を用い、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。糸様線維と剛直な線維では表面電荷、表面疎水性に大きな差異はみられず、細胞の結合性の違いは細胞表面受容体への結合能によるものであることが示唆された。

(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、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 *R. pickettii* T1 由来バイオポリエステル分解酵素の第2世代変異酵素群の機能マッピングを行った。その結果、本酵素の285位のアスパラギンが酵素活性に大きく関与しており、チロシンやアスパラギン酸などに置換されることによって水溶性基質に対する分解活性が大幅に向上することが分かった。今後、その他の優良変異と組み合わせることにより、本酵素の更なる活性向上を目指す。

(4) 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)

微生物2次元培養系に対する青色光の照射効果について、照射強度と微生物ユーグレナの反応の関係を調べた。特に周期的に光をオンオフした場合の過渡特性を計測し、光強度との関連を明らかにした。さらにビデオ解析を行うことで、過渡特性の原因となっているユーグレナの反応を個体レベルで分析し、ユーグレナの光反応の個体差に分布があること、反応の異なるタイプが3種存在すること、および光強度によって別のタイプの反応を示すようになることなどを明らかにした。また、実験を繰り返した場合にはメモリー効果が現れ、ユーグレナが光照射に対して適応することがわかった。別途、細胞密度を制御する方法として比例制御に加えて積分要素を導入し、オフセットのない密度制御を達成した。

閉鎖マイクロ流路内に閉じ込めた微生物の相互作用について、2セットの「光-微生物フィードバックシステム」の間でデータを交換し、相手側の状態に応じた光照射を行うことで独立した培養系の間にも相互作用を人工的に導入する実験を行った。2つの独立した培養系に対して、それぞれ異なるロジックで光照射を行った場合に、双方が満足する解に到達できることを確かめた。さらに相手側が密集しているところを避けるような光フィードバックをクロスで行った場合には人工的な棲み分け現象が起こることを明らかにした。

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 and characterization of DNA-polymer conjugates (Maeda, Fujita, 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 DNA-polymer conjugates with controllable and well-defined architectures via precise synthesis method. 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 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 association number of copolymer chains depended on the macromolecular composition and chain architecture. Although the association number of miktoarm star copolymer was lower than that of linear analogue, resulting in the formation of smaller particle, the core density was much higher. The colloidal stability was found to depend strongly on the core density. It was demonstrated for the first time that the DNA-hybridization induced particle aggregation is controllable by tuning molecular structure.

(2) Chromatin-like dynamic structures from DNA-functionalized nanoparticles (Maeda, Takarada, Akiyama, Shikagawa)

This study aims to create highly ordered nanomaterials, which exhibit dynamic and reversible structural changes by external stimuli. Specifically, we have been developing beads-on-a-string-like structures by assembling DNA-functionalized gold nanoparticles (DNA-GNPs) at regular intervals on a single-stranded DNA (ssDNA) template. This linear GNP assembly is expected to undergo a spontaneous change to rod-like structure by increasing the ionic strength of the dispersal medium. In this fiscal year, we assembled three DNA-GNPs on a 200-nucleotide (nt) ssDNA template. The DNA-GNP was composed of a 35-nt ssDNA complementary to a part of the DNA template and a number of 16-nt ssDNA to induce non-crosslinking aggregation. We confirmed the efficient formation of expected beads-on-a-string structures by agarose gel electrophoresis, DLS measurements, and TEM observation. The dynamic conversion of beads-on-a-string structures into rod-like structures will be demonstrated by adding 16-nt complementary ssDNA and salts to the dispersal medium.

(3) Logic gate operation based on terminal breathing of double-stranded DNA corona on the gold nanoparticles (Maeda, Kanayama, Takarada)

Molecular Boolean logic gates have received much attention over the past decade. As a building element for the molecular logic gates, DNA molecules have been considered promising by virtue of its structural and functional diversity encoded by the base sequence. Most of DNA-based logic gates thus far developed have employed oligonucleotides endowed with various functions including aptametric and catalytic activities. In this study, we examined an alternative approach for DNA logic systems by controlling local conformational fluctuation (so-called "breathing") of double-stranded DNA (dsDNA). Taking advantage of the unique colloidal stability of dsDNA-functionalized gold nanoparticles (dsDNA-GNP) and the metal-mediated base pairing, we succeeded in the construction of colorimetric

logic systems (AND and OR) that utilize the Hg²⁺ and Ag⁺ as inputs and the solution color as outputs, respectively.

(4) Detection of single-nucleotide polymorphism using DNA-conjugated gold nanoparticles (Maeda, Zako, Bu)

New sensitive detection system of single-nucleotide polymorphism (SNP) using DNA-conjugated gold nanoparticles has been developed. Single-strand DNA-linked nanoparticle decreases its colloidal stability when the complementary DNA is added into the dispersion of nanoparticle to form double-strand DNA. Observation of the initial aggregation of gold nanoparticle would enable sensitive SNP detection. We successfully observed gold nanoparticle at the single particle level with fluorescent microscopy. We also demonstrated that an LOD of added DNA was better than 1 pM.

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

Living processes are managed through the precise control of “when, where, and how” proteins are expressed. In the present study, we will develop the reversible photoregulation method of translation by using photochromic nucleobase. So far, we succeeded in the photoregulation of protein expression in a HeLa cell by using the *cis-trans* photoisomerization of the photochromic 5'-cap. This year, we control the elongation of neural cell in culture by controlling the expression of Ras protein with reversible photoregulation method of translation.

2. Bioanalytical Systems Engineering

(1) Reliable SNP genotyping using DNA-functionalized gold nanoparticles (Maeda, Takarada, Akiyama, Shikagawa)

A gold nanoparticle surrounded by a single-stranded DNA corona disperses even in high ionic-strength medium mainly due to entropic repulsion. When complementary single-stranded DNA, whose base number is identical to that of the DNA on the particle's surface, is added to the dispersion to form the fully matched duplex on the surface, the nanoparticles spontaneously aggregate in a non-crosslinking manner. This aggregation is detectable by the naked eye as a color change from red to pale blue induced by surface plasmon resonance shift. Interestingly, we have found that the double-stranded DNA-carrying nanoparticles acquire high colloidal stability when a terminal single-base protrusion exists at the interface between the DNA corona and the dispersal medium. Based on the unique colloidal phenomena, we have been developing a reliable SNP genotyping method employing oligonucleotides prepared via single-base primer extension with dideoxy chain termination method (Sanger method) as analytes. The SNP target of this study is involved in a gene of cytochrome P450 2C19 (CYP2C19*2), which is closely related to side effects of various drugs. In this fiscal year, we optimized the non-crosslinking aggregation conditions using the chemically synthesized analytes. As a result, we successfully developed the detection system, which worked well even when the conversion of the single-base extension reaction was 30%.

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

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 multi-arrayed cell-trapping units, and had succeeded in making one to one cell-pairs and following cell culturing in this system. In this year, based on this result with some improvements in microfluidic system and cell fusion method, we succeeded in inducing cell fusion through micro-slit (i.e. slit-fusion) and carried out detailed observation of the cellular events during and/or after slit-fusion. Then, following results were obtained. 1) In some cases, the nuclei did not pass through the micro-slit between the cells fused through micro-slit. 2) Some cells were spontaneously separated from the fusion partner after onset of slit-fusion. Our results will provide an important basis of novel method for induction of cell reprogramming and transdifferentiation to prepare a cellular source for regenerative medicine.

(3) Highly sensitive detection of microRNAs on a microchip (Maeda, Hosokawa, Ishihara, Hasegawa)

Towards early-stage cancer diagnosis, we have been developing a highly sensitive microRNA detection method with a power-free microchip. We had already established a protocol to detect target microRNA (miR-21-5p) by sandwich hybridization utilizing coaxial stacking effect. As a result, the limit of detection (LOD) was 0.6 nM and total detection time was drastically improved from more than 10 hours in conventional technique to 20 minutes. This year, we have applied laminar flow-assisted dendritic amplification technique and achieved an LOD of 0.5 pM without compromising rapidity of total detection time. In addition, we have demonstrated that this method is applicable to another sequence (miR-500a-3p) for diagnosis of various cancers. The next step in our project is to improve the LOD and to apply the method to biological samples.

(4) Development of microarray based immunoassay platform for high sensitive biomarker detection in human biofluid (Maeda, Hosokawa, Lee)

Microarray based immunoassays are currently undergoing intense developments for the detection of low abundant protein biomarkers in human biofluids such as serum, urine and CSF (cerebrospinal fluid). Such developments could hold promise of improving detections in early diagnosis of disease, reducing the need for biopsy and providing post therapy monitoring of patients for recurrence. This first fiscal year, we investigated enrichment effect of capturing antibody because enriching the surface density of immobilized capture antibodies enhances the detection signal of antibody sandwich microarrays. Epoxy coated glass plate were used as substrate of microarray platform. 3x9 PDMS well is directly bonding to the substrate for constituting assay platform. The plate can perform 27 immunoassay at once. As a model biomarker we used PSA (prostate specific antigen), which is the most commonly used biomarker for indicating prostate cancer or prostate related disease. As a result, optimized capturing condition has been fishing out to improve detection sensitivity of PSA immunoassay. LOD (1 to 10 pg/mL) and dynamic ranges (few pg/mL to $\mu\text{g/mL}$) were drastically improved compare to conventional ELISA (generally sub-nanogram per milliliter). Total assay time from spotting to detecting of 27 immunoassay held 4-5 hours. Next step of the study could be two ways. One is to start to test real clinical sample. For instance, how fast PSA are increased to the person who has surgery to monitoring recurrence of cancer. Second is to develop the platform further to automation and parallelization of immunoassay.

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

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. This year, we showed that NIR imaging in a living swine colon is possible.

(6) Single molecular analysis for biopolymers using a nanopore (Maeda, Fujita, Takemasa)

Nanopore, a few nano-meter hole in thin membrane, can be used to scan cross-sectional area along the main chain of each molecule. To improve the precision, and to apply nanopore analysis to a variety of biopolymers, standard sample is required, and several candidates were found. It was confirmed that introducing charged group into neutral molecule makes nanopore analysis possible, which can expand the range of target molecule. Detection of DNA conjugates. Now we are investigating DNA conjugates using a nanopore.

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). This year, we examined effect of molecular chaperone small heat shock protein (sHsp) under heat-stress conditions on A β aggregation. Since several sHsps are upregulated and co-localized with A β in senile plaques of AD patients, sHsps are thought to be involved in AD. We found formation of new-type A β amyloid by yeast sHsp at high temperature that showed lower cytotoxicity and weaker ThT dye binding than authentic A β amyloid fibrils formed in the absence of sHsp. Our results also suggest the potential protective role of sHsp in AD under stress conditions.

(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. This year, we examined the cell binding of the fibrillar and filamentous amyloids formed by both insulin and β 2-microglobulin (β 2m) using a luminescent conjugated polythiophene (LCP) as a staining reagent. We found that cell binding of both non-toxic filamentous amyloids from insulin and β 2m was less efficient than that of toxic fibrillar amyloids, clearly suggesting that amyloid toxicity could be correlated with prolonged binding of amyloids to cells.

(3) Improvement of polyester-degrading enzyme by directed evolution (Maeda, Hiraishi, Miyauchi, 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_{R_{pi}T1}). 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 functional mapping of the evolved PhaZ_{R_{pi}T1} in the second generation. Gene analysis showed that N285D or N285Y mutations were found in six of the seven improved second-generation mutants. Taking into consideration the results of *p*-nitrophenylalkanoate (pNPCn) hydrolysis and PHB degradation, it is indicated that Asn285 probably participates in the regulation of substrate recognition and the mutations at this position may likely aid in enhancing the catalytic activity for pNPCn. In near future, we will create the more improved mutant enzymes in combination with another beneficial mutations.

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

The blue-light photophobic reactions of *Euglena gracilis* cells were investigated on-chip using a new measurement, 'trace momentum' (TM), to quantitatively evaluate their swimming activity. When strong blue light was repeatedly switched on and off, a large negative spike in the TM was observed at the onset of the 'blue-light-off' phase. Single-cell trace analysis at a strong blue light showed that half of tumbling *Euglena* cells ceased activity at the onset of blue-light-off before commencing straightforward swimming, and the rest smoothly commenced straightforward swimming without delay. The proportion of freezing *Euglena* cells depended on the blue light intensity. When the cells were stimulated by four blue light pulses at the higher intensity, without pre-exposure, the transient freezing behavior was more prominent but, on repeating the stimuli after an 80 min interval in red light, the same cells did not freeze, showing that the cells had acquired an anti-freezing mechanism during the interval. Information on transient behaviors, including blue-light adaptation, will be useful to utilize *Euglena* cells as intelligent micro-agents in microfluidic devices.

Principal Investigator

前田 瑞夫 Mizuo Maeda

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

金山 直樹 Naoki Kanayama

Lee Sangwook

Karin Sörgjerd

秋山 好嗣 Yoshitsugu Akiyama

和田 健一 Ken-Ichi Wada

石原 量 Ryo Ishihara

Technical Staff

宮宇地 裕美 Hiromi Miyauchi

Students

Tong Bu

近藤栄太郎 Eitaro Kondo

平峯 勇人 Hayato Hiramine

吉田 知識 Tomonori Yoshida

位田 雄祐 Yusuke Inden

鹿川 裕翔 Hiroto Sikagawa

吉本 美夜 Miya Yoshimoto

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

武政 誠 Makoto Takemasa