

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、微生物工学

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 ナノ粒子の創製と物性評価 (前田、藤田、森田、清原)

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-*block*-DNA) の二成分ブロック重合体は室温では水溶性 (親水性) であるものの、温度上昇により PNIPAAm ブロックどうしが会合 (疎水性相互作用) し、親水性のままの DNA が表層に密生したコアシェル型のナノ粒子 (ナノミセル) を形成する。これまで、ナノミセルを化学架橋で安定化させることを試み、その架橋型 DNA 担持ポリマーミセルの構造や界面物性について評価してきた。架橋反応はミセル内のみで生じうることを見出し、架橋後もミセルが安定的に水中に分散しうる。このナノゲルは熱にตอบสนองしてそのサイズを可逆的に変化させるが、これは PNIPAAm ブロックの水和・脱水和によるものであることを詳細な構造解析により明らかにした。また物質をミセル内部に包接する能力を有していることを見出した。

(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、王、白石)

本研究の目的は、細胞核にあるクロマチンのように、階層構造を自在に構築・脱構築できる自己組織化材料を創ることである。その最初のステップとして、鋳型となる一本鎖 DNA の上に二重鎖 DNA 担持金ナノ粒子 (dsDNA-AuNP) を 3 つ配置した糸ビーズ状構造体 (トリマー) を作製し、イオン強度に応じて構造体内部の粒子間距離が可逆的に変化することを明らかにした。本年度は、配置する粒子数を数個レベルから数百個以上に増大させることに成功した。具体的には、ローリングサークル増幅法で調製した長鎖の一本鎖 DNA の上に、dsDNA-AuNP を等間隔に配置したマイクロメートルスケールの糸ビーズ状ナノ構造体を高効率で作製することが可能になった。さらに、各粒子上に担持されている dsDNA の末端塩基対合に依存して、全体の構造が劇的に変化することを見出した。dsDNA が完全相補の場合はアイランド状 (円盤状) 構造を示し、dsDNA が末端一塩基ミスマッチの場合は伸展した線状構造になることが透過型電子顕微鏡で確認された。

(3) DNA で制御された異方性ナノ材料の自己組織化 (前田、宝田、王)

一本鎖 DNA を密に担持したナノ粒子は、相補鎖を添加して二重らせんを形成させると、高イオン強度条件で直ちに凝集する。一方、末端一塩基ミスマッチ鎖を加えた場合は安定に分散する。本研究の目的は、

この特異なコロイド挙動を利用して、異方性ナノ材料の自己組織化を精密かつ動的に制御することである。本年度は、DNA 担持金ナノロッドを新たに設計・合成し、その異方性凝集について検討した。ナノロッドの両末端面は曲率が高く、表面に結合している界面活性剤の密度が側面に比べて低いいため、低濃度で系中に添加されたチオール化 DNA は優先的に両末端面の界面活性剤と置き換わって、金-硫黄結合で固定化される。つづいて異なる配列のチオール化 DNA を大過剰に添加すると、これらによってナノロッドの側面が選択的に化学修飾される。側面に担持された一本鎖 DNA の相補鎖と、両末端面に担持された一本鎖 DNA の一塩基ミスマッチ鎖を加えると、ナノロッドが側面同士で接して横に並ぶことが透過型電子顕微鏡で確認された。逆に、側面がミスマッチで末端がフルマッチの場合は、ナノロッドが縦に並んだ線形の自己集合体が形成された。

(4) 光に応答して可逆的に凝集-分散状態が変化する DNA ナノ粒子 (前田、金山、岸)

表面を DNA 二重鎖でブラシ状に覆われた金ナノ粒子 (以下、DNA ナノ粒子) は、表層の核酸塩基対合の有無に連動して水溶液中での分散挙動が変化することを報告している。この知見をもとに、フォトクロミック分子として知られるアゾベンゼン (Azo) を DNA ナノ粒子内に組み込み、その光異性化によって表層の核酸塩基対合の変化を誘起し、DNA ナノ粒子の分散挙動を光で可逆的に制御することを昨年から検討している。本年度は、Azo の trans-cis 光異性化を効率的に DNA ナノ粒子の分散挙動に反映させることを目的とし、Azo の導入位置や近傍の塩基配列の影響について系統的な検討を行ない、DNA ナノ粒子の集合-分散を可逆的かつ効果的に誘起可能な DNA 界面構造を決定した。

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)

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、高いイオン強度条件で自発的かつ迅速に凝集する (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。金ナノ粒子が凝集すると表面プラズモン共鳴シフトによって分散液の色が赤から青に変化するので、一塩基の鎖長の違いを目視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、この特異なコロイド現象に基づく SNP 精密タイピング法を開発している。本年度は、ヒト由来の実サンプルを用いて、薬剤の副作用に関連するシトクロム P450 2C19 遺伝子の SNP タイピングを行った。被験者の毛根細胞からゲノムを抽出し、標的遺伝子を PCR 増幅した。これを鋳型として一塩基伸長反応を行ない、反応物を使って非架橋凝集を誘起させた。色変化が数分以内に生じ、SNP を迅速に目視判別できることが明らかになった。

(2) 細胞培養マイクロチップの開発 (前田、細川、和田、近藤)

昨年度開発した細胞培養マイクロチップが細胞の凍結保存にも有用であることを見出した。従来、基板接着性の細胞は接着したまま凍結・解凍を行うと、大きな損傷を受けることが多いため、これら細胞を凍結保存する際には、基板から剥離する必要があるが、また解凍した後に実験を行う際には、基板に再度接着させなければならず、操作が煩雑であった。しかしマイクロチップを用いると、細胞を接着したまま凍結・解凍しても高い生存率を示すことが分かった。HeLa 細胞など 4 種類の接着性細胞株を対象に、代表的な実験条件として流路深さ 25 μm 、凍結温度 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 3 日間保存した後、室温で解凍した。生存率は 50%~80% となり、マイクロチップを用いない場合に比べてはるかに高かった。この高い生存率が得られるメカニズムは現在検討中であるが、マイクロ流路の高い流動抵抗により氷晶の運動が抑制された結果、細胞が受ける機械的損傷が小さくなることが考えられる。

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

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に検出する手法を開発している。これまでは専ら合成オリゴ RNA 標品を用いて開発を行っており、本手法が生体由来試料に適用できるほど特異性を持つか不明であったが、今年度行った実験によってかなり有望であることが分かった。市販のヒト白血球由来トータル RNA を本手法によって測定したところ、文献から高発現が予想される miR-16, 223 は検出され、低発現が予想される miR-196b, 204, 211 は検出されなかった。確認のためこれらの配列の合成オリゴ RNA を測定したところ、本手法は全

での配列で正常に機能しており、上記結果は実際の発現状況を反映していると考えられる。また、トータル RNA に合成 miR-204 (上述のとおり内在性のものは不検出) をいろいろな濃度で添加し、本手法で測定したところ、濃度に依存した信号が得られた。以上をまとめると、本手法の特異性に関して大きな問題は見られず、生体由来試料に適用できることが期待される。

(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 α -シヌクレイン (α -syn) の検出系の開発を試みた。脳脊髄液中の α -syn、特にオリゴマーを形成した α -syn はパーキンソン病のバイオマーカーとして注目されている。捕捉抗体としてモノクローナル抗体を用い、検出抗体の代わりにオリゴマー特異的なアプタマーを用いてサンドイッチ法によって検出を行った。試料体積 10 μ L で、オリゴマー α -syn の検出限界は 35 pg/mL であり、ダイナミックレンジは 0.01 ng/mL のオーダーから 100 ng/mL のオーダーにわたった。測定時間は抗体の固定化を含めて 4 h であった。モノマーとオリゴマーの選択性も良好であり、今後パーキンソン病の研究および診断への応用に期待が持てる結果が得られた。

(5) 希土類含有セラミックスを用いた近赤外バイオイメージング (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 Er³⁺および Yb³⁺を共ドープした Y₂O₃ ナノ粒子 (YNP) による NIR 蛍光イメージングに成功している。今年度は YNP を用いて、ブタをモデル動物として腹腔鏡手術への応用を試みた。YNP を含むマーカーをブタの腸壁に固定化し、腹腔鏡により腸壁の外から NIR 蛍光を検出することに成功した。これにより腹腔鏡手術において、がんの位置を確認しながらの腸切除が可能となり、成功率の向上が期待できる。

(6) ナノポアを用いた 1 分子バイオ分析 (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 分子内断面積連続評価法開発に取り組んでいる。本年度は天然物の側鎖構造分析を試みた。微生物産生の細胞外多糖類は側鎖が均一に結合していると言われるが、一方で植物由来の多糖類では側鎖がどのように分布しているか不明であり、いずれのケースでも分析が困難であった。微生物産生多糖のキサンタンガムや細胞壁構成多糖のキシログルカンについてナノポアで主鎖に沿った分子断面積を計測したところ、各分子の断面積はほぼ一定であった。これは、計測精度を考慮すると 10nm 程度の空間スケールで平均化した場合に側鎖の偏りは少なく、ほぼ均一に主鎖に結合していることを意味しており、均一構造が予想されたキサンタンガムに加えて、キシログルカンにおいても均一性が高い構造である、と示唆された。

3. バイオ高分子の科学

(1) タンパク質の高次構造形成のナノサイエンス (前田、座古、酒井、Perlenfein)

本研究では、タンパク質の高次構造形成や、それに関わる機能性タンパク質の作用機構を明らかにするとともに、これらタンパク質の新機能探索・創製を目指している。我々は、タンパク質の高次構造形成に関わる分子シャペロンの 1 種であるプレフォルディンに注目している。これまでに我々はプレフォルディンがアルツハイマー病などの原因とされるミスフォールディングタンパク質凝集を抑制し、低毒性化していることを見いだした。本年度はさらにプレフォルディンが金ナノ粒子の塩依存的凝集をサイズ依存的に抑制するという我々の発見を元に、プレフォルディンが金ナノ粒子生成に与える影響を調べている。

(2) アミロイド結合・除去能を有するナノ粒子開発 (前田、座古、Bu)

ミスフォールディングタンパク質により形成されるアミロイド線維凝集は疾患の原因となるとされており、除去法の開発が重要である。今年度は Co/C コアを有する磁性ナノ粒子を親水性カチオンポリマーである Poly[3-(methacryloyl amino) propyl] trimethylammonium chloride を表面修飾したナノ粒子 (MC-NP) が A β アミロイド凝集体に結合することを見出し、相互作用を詳細に調べた。その結果、MC-NP は A β 単量体には結合せず、アミロイド凝集体に選択的に結合することが分かった。粒子は磁石による分離・回収が容易であるため、MC-NP による A β アミロイド凝集体分離が可能となる。さらにこの結果は、ポリマー

修飾のみにより、粒子が病因因子であるアミロイド凝集への選択的結合能を有することを示している。

(3) ポリアスパラギン酸分解酵素の基質認識機構 (前田、平石)

β ペプチドは、 α ペプチドの材料としての長所を維持しつつ、その「欠点」でもある易分解性を改良した材料として注目されている。そこで我々は、 β ペプチドを含む代表的な材料である熱重合ポリアスパラギン酸(tPAA)に着目し、その生分解機構の解明を目指してきた。その研究過程において tPAA 分解に関わる酵素を2種類発見した。一つ目の酵素(PahZ1)は、 β ペプチドの連鎖を特異的に認識・切断する酵素であり、その一次構造は極めて新規性の高いものであった。そこで本年度は、本酵素の光学異性体基質認識に関する詳細な知見を得るため、 β アスパラギン酸3量体の光学異性体を用意し、本酵素による酵素分解反応を行った。その結果、本酵素の活性部位に関して次のことが明らかとなった：(i)本酵素の活性部位は4つのサブサイト(2, 1, -1, -2)からなり、3量体以上の基質を認識・切断する；(ii)サブサイト1はL-Aspユニットのみを認識するが、他のサブサイトはL-及びD-Aspユニットのいずれも認識できる；(iii)サブサイト1及び2では、(L-Asp)-(D-Asp)の配列を効率よく認識・切断する。

(4) マイクロ流路中の微生物が示す外部刺激応答の計測 (前田、尾笹)

微細藻類であるミドリムシをマイクロ流路チップ内に閉じ込め、光刺激や化学刺激などを与えたときの応答を調べ、センサー応用や計算媒体への応用を目指している。今年度は多孔質のPDMSを透過してレドックス環境を変化させる H_2O_2 に対するミドリムシの応答を計測した。マイクロチップ内の完全閉空間にミドリムシを閉じ込め、バイパス流路に H_2O_2 を流すと H_2O_2 分子が閉空間に透過してミドリムシの遊泳が変化する。 CO_2 などで見られた単純な負の化学走性ではなく、1.5%- H_2O_2 に対してミドリムシは最初は負の化学走性を示すものの10分程度で逆に H_2O_2 の濃度の高い部分に偏っていくことがわかった。

ミドリムシの遊泳軌跡を調べたところ、当初は直線的な軌跡が約10分後の H_2O_2 濃度の高い場所では連続その場回転へと変化しており、ミドリムシは鞭毛の制御を失ったような状態になって返って H_2O_2 濃度の高いところにトラップされていることが判明した。すなわち、細胞内のレドックス反応やシグナル伝達系が H_2O_2 によって重度に攪乱され、逃げられなくなってしまったと考えられる。このことよりミドリムシの遊泳軌跡を調べることで、環境の化学物質の生体への効果(毒性のタイプ)まで計測できる環境モニターへの展開が期待できる。

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, microbiological 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, Morita, Kiyohara)

We have developed poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)-*block*-DNA copolymers with controllable and well-defined architectures via precise synthesis method. The diblock copolymers self-assembled into well-defined nano-micelles owing to the assemble of PNIPAAm blocks by hydrophobic interaction above LCST in aqueous solutions. By chemical cross-linking within the nano-micelle, we have succeeded in making the nano-gel surrounded with DNA. The nano-gels disperse stably in the aqueous solutions. We proved that the nano-gels expand/shrink by hydration/dehydration of PNIPAAm segments, and its process is thermally reversible. In addition, our data suggested that the nano-gels can include and release hydrophobic molecules by temperature control.

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

The purpose of this study is to create hierarchical self-assembled materials that can exhibit dynamic and reversible structural changes like chromosomes (chromatin) in the nuclei of cells. For the first step, we have already constructed double-stranded DNA-functionalized gold nanoparticle (dsDNA-AuNP) trimers with a beads-on-a-string-like structure. In this fiscal year, we successfully constructed extremely larger assemblies of a micrometer size by using a long ssDNA template containing a continuous AuNP binding site prepared by rolling circle amplification. TEM observation revealed efficient formation of the long linear assemblies of dsDNA-AuNPs, as well as their structural shrinkage depending greatly on terminal base-pairing.

(3) Controlled self-assembly of DNA-functionalized anisotropic nanomaterials (Maeda, Takarada, Wang)

Colloidal stability of single-stranded (ss) DNA-functionalized gold nanoparticles is drastically decreased upon hybridization with a complementary ssDNA at high ionic strength. In contrast, the particles keep dispersed when the surface ssDNA is hybridized to a terminal-base-substituted ssDNA. The purpose of this study is to precisely direct dynamic self-assembly of anisotropic nanomaterials by taking advantage of this unique colloidal behavior. In this fiscal year, we prepared DNA-functionalized gold nanorods (AuNRs) to investigate the anisotropic assembly induced by the non-crosslinking aggregation. Due to a low density of surfactant on highly curved ends of AuNRs, thiolated ssDNAs added at a low concentration preferentially bound to the end regions. Subsequent addition of different thiolated ssDNAs in an excess amount led to the site-selective attachment to the side. Such facile but highly site-specific modification of DNA allowed us to program terminal base-pairing of the surface double-stranded (ds) DNA in a region-specific manner. When the dsDNAs on the side were fully matched and the dsDNAs at both ends were terminal-mismatched, the side-by-side assemblies of the AuNRs were obtained in a non-crosslinking manner. In contrast, the AuNRs formed the end-to-end assemblies upon hybridization with the complementary ssDNA at the ends and with the terminal-base-substituted ssDNA on the side.

(4) Reversible photo-induced aggregation of DNA duplex-functionalized gold nanoparticles (Maeda, Kanayama, Kishi)

We have developed a photo-responsive DNA brush layer-functionalized gold nanoparticles that incorporate terminal azobenzene moieties. These particles exhibited reversible photo-switching of their assembly behavior. Exposure to the UV light induces a trans-cis isomerization of the azobenzene moiety that produces the repulsive DNA brush layer interaction, resulting in dissociation of the nanoparticle aggregates. A cis-trans isomerization of the azobenzene moiety also occurred upon exposure to the visible light, leading to re-aggregation of the nanoparticles.

2. Bioanalytical Systems Engineering

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

A gold nanoparticle densely functionalized with single-stranded DNAs disperses even in high ionic-strength medium. When the complementary single-stranded DNA, whose base number is identical to that of the surface DNA, is added to the dispersion to form the fully matched duplex, the nanoparticles aggregate spontaneously and rapidly in a non-crosslinking manner. This aggregation is detectable by the naked eye as a color change of the dispersion from red to blue, which is induced by surface plasmon resonance shift of the gold cores. More interestingly, the double-stranded DNA-carrying nanoparticles acquire a high colloidal stability when a terminal single-base protrusion (a dangling end) exists at the interface between the DNA layer and the dispersal medium. Based on the unique colloidal phenomena, we have been developing a facile and highly reliable SNP genotyping method by employing oligonucleotides prepared via single-base primer extension with the dideoxy chain termination method (the Sanger method) as an analyte. In this fiscal year, we performed the SNP genotyping in exon 5 of the human cytochrome P450 2C19 monooxygenase gene (G681A), which is closely related to side effects of various drugs. We isolated genomic DNA from hair roots of individuals, and then amplified a fragment of the target gene by PCR. Employing the PCR amplicons as a genetic sample, we carried out the single-base primer extension followed by the non-crosslinking aggregation assay. The color change was observed within a few minutes, indicating that the rapid colorimetric SNP typing was successfully achieved.

(2) Microchip for cell culture (Maeda, Hosokawa, Wada, Kondo)

We have discovered that a microchip has an unexpected effect for cryopreservation of adhered mammalian cells. Conventionally, the cells are cryopreserved in the suspended state, because the adhered cells are vulnerable to damages during the freezing/thawing processes. Our experiments revealed that the use of a microchip greatly raises the viability of adhered cells after freezing/thawing. Specifically, we cryopreserved 4 different cell lines adhered on the bottom surface of a microchannel with a depth of 25 μm at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 days. After thawing, we observed viabilities ranging from 50% to 80%, which were much higher than the results of control culture dishes.

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

Towards early-stage cancer diagnosis, we have been developing a highly sensitive microRNA detection method using a power-free microchip. So far, we have mainly been using synthesized RNA standard samples for the device development, and hence specificity of the measurement for complex samples has been uncertain. This year, we studied the specificity using a human leucocyte-derived total RNA which is commercially available. From the total RNA, our device detected miR-16 and -223, while it did not detect miR-196b, -204, and -211. These results qualitatively agree to the literature. We confirmed that the device properly worked by measuring the corresponding synthesized RNA standard samples, which were accurately measured. In another set of experiments, the total RNA was spiked with various concentrations of miR-204. The spiked sample caused device signal depending on the miR-204 concentration. In summary, our device is likely to be useful for complex samples.

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

We have developed immunoassay platform for detection of oligomeric α -synuclein (α -syn). Levels of oligomer and monomer α -syn in cerebrospinal fluid may be used as a biomarker tool to aid in the diagnosis of Parkinson's disease. Recently, interest of detection method for oligomer form of α -syn is higher since the oligomer has more close relation to the disease. We tried sandwich immunoassay, which consists of one monoclonal antibody and oligomer-selective detection aptamer. The monoclonal capture antibody binds to all forms of α -syn, while the oligomer-selective aptamer only binds to the oligomer form of α -syn. The developed platform requires only 10 μL of sample per test and the total assay time is 4 h including the immobilization of the capture antibody. The limit of detection of the assay was 35 pg/mL of α -syn with a dynamic range covering from 0.01 to 100 ng/mL. The platform also clearly distinguishes monomer and oligomer down to sub-ng/mL level.

(5) 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 (YNP) showed NIR emission under NIR excitation. This year developed an NIR laparoscopy imaging system and demonstrated its use for accurate resection of the colon in swine. The NIR laparoscopy system consisted of an NIR laparoscope, NIR excitation laser diode, an NIR camera and NIR markers. We demonstrated that NIR emission from the NIR markers in the colon was successfully recognized through the colon using the NIR laparoscopy imaging system. These results suggest that this NIR laparoscopic surgery system may be useful for cancer site recognition and accurate resection during laparoscopic surgery for colorectal cancer.

(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 polymer molecule. Distribution of sidechain of natural polysaccharides was investigated using a nanopore. Xanthan, which is a bacterial polysaccharide believed to have regular distribution of sidechain, and xyloglucan, a plant wall polysaccharide, whose side chain distribution is not known, were investigated in the single molecular level. As a result of cross-sectional area based on nanopore current analysis, it is suggested that both polysaccharides have quasi-regular side chain distribution averaged in 10 nm scale.

3. Biomacromolecular Science

(1) Chemistry and engineering of molecular chaperone protein (Maeda, Zako, Sakai, Perlenfein)

Molecular chaperones are proteins that can recognize and bind exposed hydrophobic surfaces of non-native proteins. They can subsequently prevent protein aggregation and assist in their correct folding into a native conformation. We have focused molecular chaperone, prefoldin that captures a folding intermediate and transfers it to a group II chaperonin for correct folding. Previously we showed that prefoldin could prevent amyloid aggregation and reduce its toxicity, suggesting multi-functionality of prefoldin. Based on our previous finding that prefoldin could form a complex with gold nanoparticles in a size dependent manner, this year we are investigating the effect of prefoldin on synthesis of gold-nanoparticles.

(2) Functional nanoparticle for amyloid adsorption and extraction (Maeda, Zako, Bu)

Amyloid beta (A β) protein aggregates, which include fibrils and oligomers, are neurotoxic and are considered to cause Alzheimer's disease. Thus, separation of these A β aggregates from biological samples is important. This year, we found that strongly ferromagnetic few-layer graphene-coated magnetic nanoparticles (C/Co), which were functionalized with cationic polymer, poly[3-(methacryloyl amino) propyl] trimethylammonium chloride (polyMAPTAC) was useful for the adsorption and magnetic separation of A β aggregates. Fast adsorption (~ 1 min) of A β fibrils and oligomers onto the particles was observed. Interestingly, the A β monomer was not captured by the particles, suggesting that binding to A β molecules is toxic species-selective. This study should be useful for further elucidation of the application of nanoparticle adsorption in mediating A β toxicity.

(3) Substrate recognition mechanism of poly(Asp) hydrolase (Maeda, Hiraishi)

β -Peptides have attracted attention as materials which show potentially their enzymatic and metabolic stabilities in keeping with such advantages of α -peptides. We have examined the biodegradation of thermally synthesized poly(Asp) which contains 70 % β -Asp units in its molecule, and found two types of novel PAA hydrolases (PahZ1 and PahZ2). Especially, PahZ1 showed an interesting property of cleaving only the amide bonds between the β -Asp units in tPAA. This year, to obtain the detailed information about the substrate-steroselectivity of PahZ1, enzymatic hydrolysis of stereoisomeric β -tri(Asp)s by PahZ1 were performed. The results suggested the following structural features at its substrate binding site: (i) the active site contains four subsites (2, 1, -1, and -2), three of which are occupied by Asp units for cleavage to occur; (ii) for the hydrolysis to proceed, subsite 1 should be occupied by an L-Asp unit, whereas the other three subsites may accept both L- and D-Asp units;

(iii) for the two central subsites between which cleavage occurs, the (L-Asp)-(D-Asp) sequence is the most favorable for cleavage.

(4) External stimulation to microbes confined in microdevices (Maeda, Ozasa)

On-chip cytotoxicity sensing for liquid substances was investigated by using the microbial chemotaxis of *Euglena gracilis*. The *Euglena* cells were confined in a closed-type micro-aquarium in a PDMS microchip, and the micro-aquarium was isolated from two microchannels to flow test and reference liquid substances. Small molecules of liquids permeated into PDMS and diffused into the water in the micro-aquarium, and thus, the chemical concentration gradient of test liquids was built in the micro-aquarium. When 1.5% H₂O₂ was introduced as a test liquid (counter reference = pure water), the *Euglena* cells fell into continuous rotation instead of single step turning and/or straight forward swimming. As a result, total swimming activity in the micro-aquarium decreased even after H₂O₂ flow was switched back to water. The observation shows that the types of cytotoxic effects can be identified through the cell movement analysis.

Principal Investigator

前田 瑞夫 Mizuo Maeda

Visiting Members

武政 誠 Makoto Takemasa

孫 大原 Sohn Daewon

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

李 相旭 Lee Sangwook

秋山 好嗣 Yoshitsugu Akiyama

和田 健一 Ken-Ichi Wada

王 国慶 Guoqing Wang

Technical Staff and Contract Staff

森田 雄耶 Yuya Morita

岸 里美 Satomi Kishi

清原 瑛美 Emi Kiyohara

Students

卜 同 Tong Bu

近藤 栄太郎 Eitaro Kondo

白石 翔大 Shota Shiraishi

長谷川 和貴 Kazuki Hasegawa

根岸 里奈 Rina Negishi

酒井 光太郎 Kotaro Sakai

Tyler Perlenfein

Assistant and Part-timer

横尾 淑代 Hideyo Yokoo

古本 真澄 Masumi Furumoto