

# 前田バイオ工学研究室 Bioengineering Laboratory

主任研究員 前田 瑞夫  
MAEDA, Mizuo

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る。高分子化学、分析化学、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、生体計測の新原理・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、生体材料工学、医用工学、生命科学、環境科学、マイクロ・ナノサイエンス、その他の分野への応用を目指す。その一例としてDNA機能材料に関する研究があり、独自に開発したDNA・合成高分子複合体を、DNAバイオセンサー、アフィニティー電気泳動、SNPs 応答性ナノ粒子、刺激応答性アンチセンス試薬、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. バイオ材料の科学

### (1) DNAコンジュゲート高分子の合成と応用(前田, 宝田, 金山<sup>\*1</sup>)

化学構造と分子量が規定されたDNAコンジュゲート高分子を得るために、可逆的付加開裂連鎖移動重合法を用いて合成したポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAAm)と一本鎖DNAの末端同士を結合することによりPNIPAAm-DNAジブロック共重合体を合成した。この水溶液を相転移温度以上に加熱すると、PNIPAAmの疎水核に一本鎖DNAが密生した粒径76.7nmの高分子ミセルが自発的に形成されることが動的光散乱法により明らかになった。そのミセル分散液に相補鎖を加えて表面上で二重鎖を形成させると、高分子ミセルは凝集して粒径1.5mm以上の会合体を形成した。一方、末端ミスマッチ鎖を添加した場合は、このような高分子ミセルの会合は全く観測されなかった。本現象を利用した遺伝子診断法が開発が期待できる。

### (2) DNAナノ粒子の非架橋凝集メカニズム(前田, 藤田, 宝田, 金山<sup>\*1</sup>, Tang<sup>\*2</sup>, 山越<sup>\*3</sup>)

PNIPAAm-DNAグラフト共重合体の高分子ミセルと同様に、表面に一本鎖DNAを固定化した金コロイドも、その分散液に相補鎖を添加して二重鎖を形成させると、コロイドが自発的に凝集する。昨年度にひきつづき、これらDNAコンジュゲートコロイドの非架橋型凝集メカニズムを溶液X線小角散乱法(SAXS)により解析した。NaClまたはMgCl<sub>2</sub>存在下で自発的に凝集したDNA担持金コロイドを構造解析したところ、粒子間距離は表面に担持した二重鎖DNAの鎖長に依存しており、凝集体はある程度の規則構造を形成することが強く示唆された。一方PNIPAAm-DNAグラフト共重合体に関しては、ミセル化過程とミセルの凝集過程についての解析をした。複数の共重合体分子が自己集積することでミセル表面に一本鎖DNAが密生すること、ならびにこの過程が可逆的に生ずることを実時間で確認した。また二重鎖形成後には、DNA担持金コロイド同様に、DNA鎖長に依存した粒子間距離で凝集することを示唆する結果が得られた。

### (3) 生体由来材料のナノバイオロジー(前田, 平石, 藤田, 榊原<sup>\*3</sup>, 小宮<sup>\*3</sup>)

環境保護の観点から、生態系の循環サイクルに還元できる次世代の高分子材料として生分解性高分子が注目されている。生分解性高分子の研究課題として(1)効率的生産法の確立(2)寿命コントロール技術の確立(3)高性能・高機能材料化が挙げられる。これまでに、寿命コントロール技術の確立を目指した研究として、高分子分解反応における酵素ドメインの役割を調べてきた。しかしながら、従来の解析法ではマクロな情報しか得られず、酵素-高分子表面間の相互作用を直接調べることは出来ていない。また、高性能・高機能材料化を目指した研究として、我々は酵素の基質特異性を活かした高分子構造制御に注目している。本研究では、ナノレベルにおける酵素-高分子表面間の相互作用解明とともに、高分子分解酵素による新規高機能高分子の創製を目指す。

まず本年度は、ポリヒドロキシブタン酸(PHB)材料表面とそれを分解する酵素分子間の相互作用を調べるため、種々の変異酵素の作製、およびそれらの発現・精製系の構築を行った。その結果、活性型酵素として1L培養の菌体から10mgの高純度タンパク質が得られた。さらに、PHB分解酵素の吸着/解離の挙動を表面プラズモン共鳴法(SPR)および原子間力顕微鏡法(AFM)により調べた。その結果、酵素は生分解性ポリエステルに対して高い親和性を示すことが明らかとなった。さらに吸着力の負荷速度依存性を解析し、分子間距離に対する吸着/解離相互作用ポテンシャルを求めた。また高機能材料合成に関して、我々が新たに見いだしたポリアスパラギン酸分解酵素を利用したポリアミノ酸合成を行い、非天然型骨格を有するポリアスパラギン酸の合成に成功した。

### (4) タンパク質の高次構造形成のナノサイエンス(前田, 座古, 今中<sup>\*4</sup>, 迫野<sup>\*5</sup>, 寺田<sup>\*1</sup>, 内海<sup>\*3</sup>, 中村<sup>\*3</sup>)

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。プレフォルディンは生体内で基質タンパク質を捕捉し、シャペロンタンパク質と協調して働くと考えられている。本年度はプレフォルディンが低温条件においては変性タンパク質を巻き戻す活性を有することを明らかにした。さらにこれを応用し、ゲル担体にプレフォルディンを固定化することで、変性タンパク質を効率的に巻き戻す系の開発を行った。また、プレフォルディンはタンパク質以外にも、量子ドットのような金属化合物を捕捉し凝集を抑制し得ることを見出した。現在は金ナノ粒子などへの応用を検討している。

さらに我々は、タンパク質の繊維形成に着目している。タンパク質はミスフォルディングの結果繊維形成する場合があり、疾患の原因となっている。我々はこれまでに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の繊維形成に上記のプレフォルディンが関与していることを発見した。プレフォルディンとアミロイドの相互作用解析などにより、プレフォルディンが繊維形成を阻害することで毒性の高いアミロイドオリゴマーが形成されることが示唆された。現在は生体内での関与を明らかにすべく、培養細胞を用いたノックダウン実験などを行っている。

その他に我々はホルモンペプチドであるインスリンの繊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い糸様繊維を形成することを見出した。本年度は新規に得られた繊維がこれまでに知られていた剛直な繊維と異なり、細胞毒性が非常に低いことを見出した。現在はこれを応用し、細胞培養基盤への応用などを検討している。

(5) 光異性化ヌクレオシドによる機能性核酸の活性制御 (前田, 小笠原<sup>\*4</sup>)

リボザイム・アプタマーといった機能性核酸を光制御しよとする試みがなされ、現在までにケージド核酸、アゾベンゼンを用いた方法が報告されている。しかし、一方通的制御、高さによる不正確なスイッチングなど問題点が残る。そこで、最小限のモディフィケーションで効果的かつ可逆的に光制御するための新規光応答性ヌクレオシドの開発に着手した。本年度は、光異性化ヌクレオシド 8-styryl-2'-deoxyguanosine(8STG)を合成し、その光異性化特性を調べた。結果、8STG は 370 nm で E から Z、254 nm で Z から E へ異性化し、効率的な可逆性を示した。また、耐久性にも優れていることが示された。

## 2. マイクロ/ナノ分析化学

(1) アフィニティーキャピラリー電気泳動による遺伝子一塩基変異の検出 (前田, 宝田, 小川<sup>\*4</sup>, 金山<sup>\*1</sup>, クンドウ<sup>\*1</sup>, 木村<sup>\*3</sup>)

遺伝子一塩基変異を簡便に定量検出することを目指して、ポリエチレングリコール-DNA ジブロック共重合体(PEG-*b*-DNA)を移動度シフト試薬に用いたアフィニティーキャピラリー電気泳動を開発している。移動度シフト試薬と相補的な正常型サンプル DNA が一塩基変異型よりも遅れて電気泳動し、明瞭に異なる 2 本のピークが観測されるというものである。本年度は、サンプル DNA の電気泳動移動度と、PEG-*b*-DNA とサンプル DNA の結合定数の相関関係を明らかにした。さらに、ペプチド核酸(PNA)と PEG のブロック共重合体を移動度シフト試薬に用いて、変異部位が分子内で塩基対を形成している(フォールディングしている)一本鎖 DNA の正常型と一塩基変異型を室温で分離識別することに成功した。

(2) アフィニティー電気泳動用マイクロチップの開発 (前田, 細川, 韓<sup>\*4</sup>, 井上<sup>\*3</sup>)

マイクロチップを用いたアフィニティー電気泳動法を研究している。これまで、100 塩基以上の長鎖 DNA サンプルに対して本法を適用する場合、サンプルが高次構造をとってしまい、配列を認識できないことがしばしばあった。本年度はこの問題の解決策として、「補助 DNA」の使用を試みた。補助 DNA は認識すべき配列の隣接領域に結合できる一本鎖であり、これをあらかじめ結合させることによって、高次構造の形成が防げる。この実験ではヒト *CYP2D6* 遺伝子の 3 箇所の変異を選び、それぞれ 105 bp, 111 bp, 112 bp の領域を PCR 増幅してサンプルを作製した。いずれの場合も補助 DNA を使用した場合のみ配列認識が可能であった。

(3) ナノ粒子を利用した遺伝子診断マイクロチップの開発 (前田, 細川, 佐藤(保)<sup>\*4</sup>, 佐藤(貴)<sup>\*3</sup>)

完全相補の二本鎖 DNA を担持した金ナノ粒子は、金平板上に固定化された二本鎖 DNA の自由末端が相補的な場合に吸着する。本年は平板上の DNA 末端の塩基対配列の違いによる粒子の吸着傾向を調べた。最も強い相互作用は相補的な末端間で観察されたが、ミスマッチ末端においてもプリン塩基を含む場合、弱い相互作用があることが分かった。プリン塩基はピリミジン塩基に比べて凝集力が強いことが知られているため、吸着作用にはスタッキング相互作用が関係していることが示唆された。

(4) 微小電極を利用したマイクロチップの機能化 (前田, 細川, 佐々木<sup>\*4</sup>)

マイクロの交流電界下で顕在化する溶液流れ等に注目し、これらを利用したオンチップバイオ分析の機能化、高度集積化に取り組んでいる。本年はマイクロ流路内に配置した微小電極で溶液流れを誘起し、これによる混合・反応時間の短縮を検討した。また溶液組成や電極配置などの実験条件に依存して、電圧印加時に溶液が二相分離することを見出した。種々の蛍光標識分子を用いて検討した結果、疎水性の高い脂質分子が電極近傍に選択的に捕集され、本現象がオンチップ分析における新規濃縮操作に利用できることが示された。

(5) 脂質膜コート微粒子を用いた生体膜分子の電気泳動 (前田, 細川, 鈴木<sup>\*4</sup>)

近年、固体基板上的脂質二分子膜に沿って、脂質や膜タンパク質などの難水溶性分子を電気泳動分離する技術が注目されている。しかし、平面基板上での分離には、分離成分の回収、大量精製が困難という欠点があった。本研究では、脂質二分子膜コート微粒子をカラム内に充填・圧縮することで、微粒子上の膜を融合一体化させ、融合一体化した膜に沿って脂質分子を分離する技術を開発した。今後、膜タンパク質分離への適用が期待される。

(6) STM核酸塩基分子探針を用いたDNA配列決定 (前田, 大城<sup>\*4</sup>)

走査型トンネル顕微鏡(STM)による DNA 鎖の観察は、原子の化学種や官能基の識別能に乏しいため、核酸塩基の配列決定には至っていない。これまで我々は核酸塩基を化学修飾した分子探針を開発し、ペプチド核酸塩基鎖を試料として測定を行い、探針上の核酸塩基と試料相補的核酸塩基との間に生じる相補的な核酸塩基対間の電子波動関数の重なりを介した分子間電子トンネル効果により、相補的な核酸塩基分子のみを可視化検出することに成功した。本研究では、核酸塩基探針を用いて、実試料の一本鎖 DNA の配列決定をすることを目的としている。しかし、これまでのところ、一本鎖 DNA を安定で再現性良く STM 測定を行う系は、確立されていない。本年度、DNA 鎖の STM 測定溶媒として、イミダゾリウム系のイオン液体を用いることで、大気中、室温下で安定・再現性の良い分子像を得ることに初めて成功した。このイオン液体は、STM 溶媒として用いられてきた有機溶媒と異なり、不揮発性であるため、試料濃度が測定中に変化せず安定な測定が可能となった。さらにイオン液体中の陽イオンが、DNA 鎖に対して選択的に錯形成をすることにより、十分量の試料 DNA を溶解し、生成したイオン錯体は疎水的な STM 測定基板に対して強く吸着、その結果安定な STM 測定可能となった。

## 3. 生命科学計測のための材料・デバイス開発

(1) 半導体を利用した細胞と生体分子の計測法の開発 (前田, 尾笹)

小規模の細胞グループの状態を長時間連続して測定する半導体デバイスの開発を目指した研究を行ってきている。細胞グループの活性度計測は、「細胞が受ける影響からみた」対象分子を検出する方法(定質分析)として重要性が高まっている。前年度までに、「半導体表面のバイオ適応インターフェイス技術」として、ゾルゲル法によるTiO<sub>2</sub>薄膜をゲート膜とした2DEG-FET(2次元電子ガス電界効果トランジスタ)を作成し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する感度として410mV/mMという市販のISFETでの実測と比べて100倍以上大きな感度を実現してきた。今年度はその素子の上で細胞グループを1週間程度培養し、細胞の活性度に対応していると思われる信号変化を測定することに成功した。細胞が分裂と伸展によってゲート部分の表面被覆を高めている期間の間にはゲート電圧が減少を示し、細胞が損傷を受け死滅に至る過程ではゲート電圧は上昇を示した。これらの信号の起源としては、細胞が放出するイオン種やスーパーオキシド類によるTiO<sub>2</sub>ゲート薄膜表面および内部のイオンバランスの変化が考えられるが、その詳細は現在検討中である。

(2) 希土類含有セラミックスを用いた新規なバイオイメージングプローブの開発 (前田, 座古, 寺田<sup>\*1</sup>, 迫野<sup>\*5</sup>, 永田<sup>\*3</sup>, 内海<sup>\*3</sup>)

本研究では、近赤外(NIR)光を励起光として可視領域での蛍光を発するアップコンバージョン(UC)発光を示す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。本年度は、Er<sup>3+</sup>ドープY<sub>2</sub>O<sub>3</sub>ナノ粒子(Er-Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)表面にポリエチレングリコール(PEG)を共有結合的に修飾することにより粒子の分散安定性の向上することに成功した。PEG修飾したEr-Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粒子は980nmの励起光により650nmのUC発光を示した。また細胞毒性の評価など、バイオイメージングプローブとしての基礎検討を行った。現在はガン細胞イメージングなどへの応用を検討している。

(3) 機能性核酸を用いたバイオセンサーの開発 (前田, 小川<sup>\*4</sup>)

アプタマー・リボザイム・アプタザイムなどの機能性核酸を用いたバイオセンサーの開発を行っている。昨年度は、アプタザイム及び anti-RBS 配列を用いて、in vitro で機能する人工リボスイッチを構築した。このリボスイッチはアプタザイムの補因子に呼応して下流遺伝子の発現を行うため、下流遺伝子にレポータータンパク質を用いることにより、アプタザイムの補因子を簡便にセンシングすることができる。本年度は、このリボスイッチセンサーの in vivo (大腸菌)での挙動を調査した。その結果、細胞内における人工リボスイッチの性能は、昨年度行った in vitro のものに比して劣っていたが、培養温度の最適化や cascading system を導入することにより、細胞内においても、高い S/N 比で標的分子をセンシングすることに成功した。

---

\*1協力研究員 \*2アジア連携 \*3研修生 \*4基礎科学特別研究員 \*5 訪問研究員

This laboratory is working on a new frontier of research that fuses biological science and engineering. Incorporating polymer chemistry, analytical chemistry, biochemistry, and molecular biology, we study new materials comprised of biological components and develop novel methodologies for bioanalysis, medical diagnosis, and artificial systems that regulate biological processes. Our work has been applied to research and developments in biomaterials science, medical engineering, life sciences, environmental science and micro/nanoscience. As an example, we newly prepared DNA-vinyl polymer conjugates that were used in a DNA biosensor, affinity electrophoresis, a SNPs-responsive diagnostic nanoparticle, a stimuli-responsive antisense drug, and an artificial gene regulation system. Our work might be more accurately called : DNA engineering.

## 1. Biomaterials science

### (1) Synthesis of DNA-polymer conjugate and its applications

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) prepared via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization was conjugated with single-stranded DNA (ssDNA) to obtain a diblock copolymer of PNIPAAm and ssDNA (PNIPAAm-*b*-DNA) with narrow molecular weight distribution. When an aqueous solution of PNIPAAm-*b*-DNA was heated above the lower critical solution temperature, the block copolymers self-assembled to form a polymeric micelle with a dehydrated PNIPAAm core surrounded by ssDNA shell. The diameter of micelle was determined to be 76.7 nm from dynamic light scattering measurement. When the complementary ssDNA was added to the dispersion of micelle to form full-matched double helices on the surface, the micelles spontaneously formed aggregates with diameter of 1.5 μm or above. On the other hand, no aggregation was observed when the terminal-mismatched ssDNA was added to the dispersion. The unique behavior of polymeric micelle will be applied to novel gene diagnosis.

### (2) Non-cross-linked aggregation mechanism of DNA-linked nanoparticle

As similar to the case of the micelle of PNIPAAm grafted with ssDNA, ssDNA-linked gold nanoparticle decreases its colloidal stability when the complementary DNA is added into the dispersion of nanoparticle to form dsDNA. We examined the non-cross-linked aggregation mechanism of these DNA conjugate materials using solution small-angle X-ray scattering (SAXS). It was found that the gold particles with dsDNA aggregates with a certain structural order in the presence of NaCl or MgCl<sub>2</sub>. The interparticle distance between the gold particles varied with the length of dsDNA. For PNIPAAm grafted with ssDNA, the SAXS showed that the graft polymer forms colloidal particles with a dehydrated PNIPAAm core surrounded by ssDNA, and the coil-globule transition is reversible. In addition, we confirmed that the nanoparticles aggregate after hybridization with full-matched DNA.

### (3) Synthesis and nanobiology of bio-based materials

Biodegradable and bio-based polymers have attracted academic and industrial interest as one of solutions to environmental problems. The research on these polymers has been carried out in viewpoints of (1) establishment of their effective production, (2) regulation of their biodegradation rate, and (3) production of the polymers with desirable properties and functions.

Regarding the research on the regulation of the biodegradation rate, the interaction between poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] (PHB), which is one of the representative bio-degradable polymers, and its depolymerase by a combination of PCR random mutagenesis and an in vivo screening system has been investigated in order to identify the amino acid residues relating to the PHB adsorption. In this study, we prepared several PHB depolymerase mutants with high purity to investigate how these amino acids contribute to the enzymatic adsorption. We purified the enzyme from the soluble fraction of recombinant *E. coli*, and approximately 10 mg of the enzyme was yielded from the cells grown in 1 L culture medium. Binding property of PHB depolymerase to biodegradable polymer was examined by surface plasmon resonance (SPR) and atomic force microscopy. These analyses indicated that the PHB depolymerase has a higher affinity to biodegradable polymers such as P(3HB) and PLLA than other non-degradable polymers. The unbinding force in AFM measurement was found to depend on the loading rate of AFM cantilever tip, and an energy landscape of the PHB depolymerase-polymer surface was elucidated.

For the production of a novel functional polypeptide, we carried out enzyme-catalyzed polymerization by taking advantage of substrate recognition by PAAhydrolase-1 from *Pedobacter* sp. KP-2 and successfully synthesized an unnatural poly(*b*-aspartate) using the hydrolase.

### (4) Chemistry and engineering of protein folding

To become functionally active, newly synthesized amino acids chains must fold to unique three-dimensional structures. Recent evidences have shown that many newly synthesized proteins require molecular chaperone proteins to reach their native state efficiently. In order to solve the molecular mechanism of chaperone-assisted protein folding, we have studied the mechanism of prefoldin. Prefoldin is a molecular chaperone that captures a protein-folding intermediate and transfers it to a group II chaperonin for correct folding. We have found that prefoldin can enhance refolding of denatured lysozyme at relatively low temperatures, possibly due to weak affinity to substrate protein. Based on this finding, we have developed prefoldin-assisted protein refolding system using prefoldin-immobilized Sepharose gel.

A number of proteins and peptides have been found to aggregate into fibrils that cause various diseases. Amyloid β peptide (Aβ) forms typical fibrils and is known to cause Alzheimer's disease (AD). However, the pathological mechanism is still unknown. We have found that molecular chaperone prefoldin induces a formation of highly toxic soluble Aβ oligomer in vitro due to specific binding of prefoldin to soluble oligomers. Now we are investigating its molecular mechanism in vivo.

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. Now we are investigating its application for cell culture matrix.

### (5) Photoregulation of functional nucleic acids by photochromic nucleoside

Azobenzene derivatives have been incorporated into functional nucleic acids to control activities by light illumination.

Although such photoactivation systems have shown reversibility, the active/inactive ratio was not sufficiently high, due to the installation of the bulky azobenzene chromophore which may influence the active-state conformation. Therefore, if the photoisomerization function was directly installed to a biomolecule instead of attaching a photochromic compound, it would lead to a more powerful photoswitching method. We have successfully developed a photochromic 2'-deoxyguanosine, 8-styryl-2'-deoxyguanosine (8STG). This compound shows a very rapid and highly efficient reversible E-Z photoisomerization upon illumination at specific wavelength. In addition, E-Z photoisomerization can be iteratively performed by alternate illumination with monochromatic 254 nm and 370 nm light without any side reactions.

## 2. Micro/nanotechnology-based analytical systems

### (1) Micro/nanotechnology-based analytical systems

Towards facile quantification of point gene mutation, we have been developing an affinity capillary electrophoresis using a polyethylene glycol-DNA diblock copolymer (PEG-*b*-DNA) as a mobility shift reagent. The wild type of single-stranded DNA (ssDNA), which is complementary to PEG-*b*-DNA, migrates more slowly than its single-base mutant type, resulting in the observation of two distinct peaks on the electropherogram. In this fiscal year, we clarified the relationship between the electrophoretic mobility of target ssDNA, and the association constant of the complex via hybridization of target ssDNA and PEG-*b*-DNA. In addition, we succeeded in separating folded sample ssDNAs at room temperature by using PEG-*b*-DNA as a novel mobility shift reagent.

### (2) Affinity microchip electrophoresis

We have been developing a microchip for affinity capillary electrophoresis (ACE). So far, we often encountered difficulty in sequence recognition of long (> 100 bases) DNA samples because of the secondary structures. To overcome this problem, we have introduced "helper" DNA, which prevents formation of the secondary structure, to on-chip ACE. For three point mutations of *CYP2D6* gene, sequence recognition was successful only when the helpers were used.

### (3) Nanoparticle-based genetic analysis on a microchip

DNA duplex-modified gold nanoparticles adsorb onto a DNA duplex-modified flat surface without molecular cross-linking. The understanding of the phenomenon was taken in place by changing the base pairings of the DNA terminal at the flat surface. The strongest attraction force appeared when the termini have fully-matched base-pairings. Mismatches at the terminus exert a weak attraction but had an interesting tendency: purine bases exert greater attraction force than pyrimidine bases. This tendency suggests that the helix stacking interaction would be the main mechanism of adsorption.

### (4) Functional microchip using microelectrodes

We have been developing functional and highly integrated microchip for bioanalysis utilizing AC electrokinetic phenomena which become obvious under microscale electric fields. We observed demixing of fluids in microchannels under AC electric fields with specific experimental conditions including solution composition and electrode configuration. As a result, hydrophobic biomolecules such as lipids were selectively concentrated near the electrodes.

### (5) Electrophoresis of membrane-associated biomolecules using bilayer-coated particles

A method for electrophoretic separation of membrane-bound biomolecules has been developed by utilizing a packed bed of bilayer-coated particles as an electrophoretic medium. The inherent large surface-to-volume ratio and redispersibility of the particle bed facilitate large-scale separation and easy manual collection of the fractions, respectively. We carried out proof-of-concept experiments using charged lipids as the samples for separation.

### (6) A Method of DNA Sequencing based on Intermolecular Electron Tunneling

STM molecular imaging of DNA has potential for a rapid sequencing of full-length genomes. However, it is a challenge to image a DNA strand with STM because of its self-aggregations on STM substrates. The main problem is the weakness of the interaction between the phosphate group of DNA and the substrates. In this fiscal year, we utilized imidazolium ionic-liquid as DNA solvents and achieved STM molecular images of DNA strands under ambient conditions. The imidazolium cation selectively bound and neutralized the phosphate anions that prevent the DNA strand from stable absorptions with the substrates. The neutralized imidazolium-bound DNA strands strongly attached to the hydrophobic STM substrates so that double-stranded DNA images were easily obtained. This ionic liquid-assisted STM imaging of DNA would be applicable to sequencing of genomes, and evaluating of DNA/RNA secondary structures and DNA/protein interactions.

## 3. Bio-sensing Materials and Devices

### (1) Development of bio-nano sensors based on 2DEG-FET structure for cell activity measurements

The final goal of this research is to develop biosensors with which cell viabilities can be detected in a long-term measurement. In this year, we executed long-term measurements on TiO<sub>2</sub>/2DEG-FETs (two dimensional electron gas field effect transistors) we have developed, with cell culture on their gate surfaces. The obtained V<sub>gs</sub> signal shows a temporal evolution with a good correspondence to the cell viability of cultured cells, i.e., decrease in V<sub>gs</sub> was observed for the period of cell adhesion and expansion on the gate surface and increase in V<sub>gs</sub> for the period of cell damage and death. The origin of V<sub>gs</sub> change is not clear at this moment, but we consider the origin should be such as the emission of ionic species or fragile proteins from the cells.

### (2) Chemistry and engineering of protein folding

Upconverting (UC) phosphors (UCPs) are ceramic materials doped with rare earth ions. These materials can absorb and upconvert infrared (IR) radiation to emit visible light and are potentially useful reagents for use in bioimaging. In order to utilize UC nanoparticles as bioimaging probes it is important to prevent aggregation of UCP molecules in aqueous milieu. We have covalently attached poly(ethylene glycol) (PEG) to the surface of Er-doped Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Er-Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles in order to improve their dispersion stability in aqueous milieu. The UC emission properties and cell toxicity of PEG-modified Er-Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (PEG-Er-Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles were also examined to assess the potential use as bioimaging probes.

### (3) Development of biosensors using functional nucleic acids

We have been developing biosensors using functional nucleic acids (aptamer, ribozyme, aptazyme and so on) to detect various molecules. In last fiscal year, we used an aptazyme and an anti-RBS (ribosome binding site) sequence to construct an artificial riboswitch that functions in vitro. Because this riboswitch regulates the downstream gene expression in response to the cofactor of the aptazyme, the cofactor can be easily detected by the use of reporter gene (e.g. b-galactosidase) as the regulated downstream gene. In this fiscal year, we performed in vivo (*E. coli*) application of this aptazyme-based riboswitch sensor. Although this riboswitch did not function well in vivo at normal temperature (37 °C) in spite of its high activity in vitro at this temperature, it worked well at lower temperature (23 °C). We also improved the switching efficiency by constructing a cascading system.

#### *Staff*

##### *Head*

Dr. Mizuo MAEDA

##### *Members*

Dr. Kazuo HOSOKAWA

Dr. Kazunari OZASA

Dr. Tohru TAKARADA

Dr. Masahiro FUJITA

Dr. Tomohiro HIRAISHI

Dr. Tamotsu ZAKO

Dr. Aishan HAN<sup>\*1</sup>

Dr. Masashi IMANAKA<sup>\*1</sup>

Dr. Atsushi OGAWA<sup>\*1</sup>

Dr. Shinji OGASAWARA<sup>\*1</sup>

Dr. Takahito OHSHIRO<sup>\*1</sup>

Dr. Naoki SASAKI<sup>\*1</sup>

Dr. Yasunobu SATO<sup>\*1</sup>

Dr. Kenji SUZUKI<sup>\*1</sup>

Dr. Naoki KANAYAMA<sup>\*2</sup>

Dr. Lal Mohan KUNDU<sup>\*2</sup>

Dr. Naofumi TERADA<sup>\*2</sup>

---

<sup>\*1</sup>Special Postdoctoral Researcher      <sup>\*2</sup>Contract Researcher

##### *in collaboration with*

Dr. Toshiaki KUDO (Environ. Mol. Biol. Lab.)

Dr. Hideo NAKASHITA (Environ. Mol. Biol. Lab.)

##### *Visiting Members*

Dr. Jun NAKANISHI (PRESTO, JST)

Dr. Masafumi SAKONO (PRESTO, JST)

##### *Trainees*

Mr. Akira INOUE (Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci.)

Ms. Eriko MASUDA (Dept. Innov. Eng. Mater., Tokyo Inst. Technol.)

Mr. Hiroyasu NAGATA (Grad. Sch. Indust. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

Mr. Shizuto YAMAKOSHI (Fac. Eng., Univ. Tokyo)

Ms. Ayumi KIMURA (Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo)

Mr. Naoya KOMIYA (Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo)

Mr. Takahiro SATO (Grad. Sch. Indust. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

Ms. Yoshie NAKAMURA (Fac. Sci., Toho Univ.)

Mr. Arata UTSUMI (Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. of Agr. and Technol.)