

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、潘、Ooi)

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 (分子集積体) を自発的に形成する。本年度は、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分子集積体の開発を試みた。ATRP により、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共重合体の合成に成功した。それら共重合体ならびにミセルの特性解析を行った。

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

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、相補鎖を添加して二重鎖を形成させると粒子は自発的に凝集する。この非架橋型の凝集は疎水核の材質によらない。昨年度にひきつづき、これら DNA コンジュゲートナノ粒子の非架橋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 存在下で凝集した DNA 担持金ナノ粒子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、凝集体は結晶様の規則構造を形成する。しかしながら DNA 密生層が互いに重なり合いながら凝集構造を形成しうることが強く示唆された。また粒子間距離は DNA の密生度や疎水核径に強く依存する。同一径で DNA 鎖長が異なる場合は互いに相溶し凝集するが、異なる疎水核径の粒子が混在する場合は分離凝集する。これらのことから、分散安定性は密生層の熱的ゆらぎに起因する反発力の寄与が大きく、凝集構造はファンデルワールス引力と DNA 鎖による立体反発力のバランスによって規定されると思われる。

(3) 走査型トンネル顕微鏡による DNA の単分子イメージング (前田、大城)

界面上の DNA 二重鎖の現象を単分子レベルで調べるため、チオール誘導体として金板に固定した DNA 二重鎖および DNA 四重鎖 (i-motif や G-quartet) 等の DNA アプタマーの可視化に成功した。特に i-motif の pH 依存的な四重鎖形成の様子を単分子レベルで観察することにはじめて成功した。また DNA 鎖の単分子観察系として、DNA とカーボンナノチューブ (CNT) の複合体を用いた観察系確立を行った。両端にチ

オール基をもつ DNA 鎖を単層カーボンナノチューブ(SWNT)と混合し、水溶液中で超音波処理することで複合体を形成させた。作成したチオール DNA/SWNT 複合体を金基板上に展開し、水溶液中での STM 測定を行い、水溶液条件下での単分子観察系確立にはじめて成功した。

(4) 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)

ケージド化合物・アゾベンゼンを用いた核酸分子の光制御には一方向への制御、高高さによる不正確なスイッチングなど問題点が残る。これらの問題を解決すべく我々は核酸塩基そのものに光異性化能を付加した新規光応答性人工塩基“フォトクロミック塩基”を考案した。これまでに数種類のフォトクロミック塩基の開発し、二本鎖形成の可逆的光制御やアプタマーの結合能を可逆的に光制御することに成功した。しかし、生体分子に損傷を引き起こす紫外領域の光が必要であったため、細胞への応用にはいってなかった。そこで、本年度は可視光領域の光で制御できる新しいフォトクロミック塩基の開発に取り組んだ。アルケニル型からアゾ型にしたことで、トランス体からシス体、シス体からトランス体の両異性化反応とも可視光領域の波長でおこなえるようになった。しかし、シス体の熱的安定性が低いため今後改良が必要である。

2. バイオ分析システムの開発

(1) アフィニティーキャピラリー電気泳動による遺伝子診断 (前田、宝田、松岡、塚田、渡邊)

遺伝子の一塩基変異を簡便に定量検出する手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。アフィニティープローブと相補的な正常型のサンプル DNA は、泳動中にプローブと複合体を形成するため、一塩基変異型のサンプル 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。また、フォールディングするサンプル DNA を分離するために、より強いアフィニティー相互作用をするプローブとして、ペプチド核酸と PEG のジブロック共重合体 (PEG-*b*-PNA) も設計している。本年度は、これまでと異なる分離モードであるキャピラリーゾーン電気泳動においても PEG-*b*-DNA がアフィニティープローブとして機能することを実証した。また、種々の長さの PEG-*b*-PNA を合成し、サイズ排除クロマトグラフィーにより分子量を測定した。さらに、フォールディングするサンプル DNA を室温で分離するために、PEG-*b*-PNA 濃度などの電気泳動条件の最適化を試みた。

(2) キナーゼ活性測定用マイクロチップ (前田、細川、韓、臼田)

マイクロチップを利用したキナーゼ活性測定法を開発を研究している。これまでにリン酸基特異的なアフィニティー電気泳動 (μ PAE) を開発し、チロシンキナーゼ Src の酵素活性の測定に成功した。本年度は、さらに μ PAE をセリン/スレオニンキナーゼ PKA 及びカゼインキナーゼ 2 (CK2) に適用した。その結果、セリン/スレオニンキナーゼにおいては、マイクロチップ流路に充填するリン酸基結合試薬 Phos-Tag の濃度を 1 mM まで上げることにより、Src と同じ程度の感度が得られた。さらに、チロシン脱リン酸化酵素である LAR も Src 同様な条件下で酵素活性測定に成功した。今後は、がん細胞中のキナーゼ活性を測定する予定である。

(3) 細胞融合マイクロチップの開発 (前田、細川、佐々木、森崎)

マイクロ流路を利用する細胞融合法の開発に取り組んでいる。昨年度は幅 1 μ m 程度のスリット構造を有するマイクロ流路を作製し、流体圧力を利用して 2 個の細胞をスリット越しに接触配置する手法を開発した。本年度はセンダイウイルスエンベロープを融合剤に用い、マウス胚性幹細胞とマウス体細胞を、細胞核同士を離れたまま融合させ、細胞質のみを混合することに成功した。現在はスループットの向上を目指し、流路を並列配置したデバイスでの細胞融合を検討している。今後、ゲノム改変を伴わない細胞初期化法としての応用が期待できる。

(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。本年度は、 Er^{3+} および Yb^{3+} を共ドープした Y_2O_3 ナノ粒子($\text{ErYb-Y}_2\text{O}_3$)を作成した。 Yb はより蛍光強度増強のために用いている。その結果、モデル動物の皮下の蛍光を得ることに成功し

た。現在がんイメージングなどへの応用を検討している。

(5) ナノポアを用いる単分子糖鎖シーケンサー（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、分子のサイズと同程度である特徴を活かして、高速1分子検出が可能な、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定電流が観測される。粒子がナノポアを通過する際には、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。この測定を精密に行うことで、分子の通過時間に依存するパルス長と、分子の断面積で支配されるパルスの振幅を評価した。本年度は、2~50 nm 程度のナノポアを安定して開ける技術の確立、ピコアンペアメータの作製、溶液セルの作製を行い、ナノポアを利用したコールターカウンター式1分子計測系のセットアップを構築した。報告例のあるDNAで測定系の検証を行い、新たに複数種類の多糖類を用いて、パルス状のポア遮断電流を観測することに成功した。今後、より精密な測定を行うことにより、1分子糖鎖シーケンサーを始めとする応用への道が開けると期待される。

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、迫野、寺田、Sörgjerd、伊藤）

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の線維形成に関与していることを発見した。これまでは古細菌由来のプレフォルディングをモデルとして用いてきたが、本年度はヒト由来の配列を有するプレフォルディングを発現・精製を行い、同様の働きがあることを明らかにした。現在は他の疾患タンパク質の凝集への関与を検討している。

(2) インスリンアミロイドの物性（前田、座古、迫野、小林）

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い糸様線維を形成し、さらに細胞毒性が非常に低いことを見出した。本年度は線維構造をさらに詳細に検討した結果、βシート積層様式が異なることが示唆された。現在は他の糸様線維を形成するタンパク質についても細胞毒性、線維構造を同様に調べ、これらに相関があるかどうかの検討をおこなっている。

(3) バイオポリエステル分解酵素の吸着メカニズム（前田、平石、大熊）

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。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を通し、バイオポリエステルの生分解制御に関する知見を得ることを目的とする。昨年度は、固体表面吸着ドメイン(SBD)に変異を有する酵素を用いて相互作用に関与しているアミノ酸の機能について重点的に調べ、酵素中の疎水性残基が吸着活性を向上させることを明らかにした。そこで本年度は、この知見を基に酵素の高性能化を行った。比較的疎水性度の低いTyr443を対象とし、吸着能向上による本酵素の高性能化を試みた。変異酵素の設計では、①アミノ酸置換による疎水性度の上昇、②β構造の維持および、③置換前後の容量変化が最小となることを考慮した。その結果、TyrのPheへの置換(Y443F)が最も適していると判断し、Y443F変異酵素を作製してその性質を調べた。その結果、Tyrから高疎水性度のPheへの置換によって、本酵素の吸着活性が向上されるとともに、ポリマー分子鎖の可溶化能の向上も達成できたことが示唆された。

(4) 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、Tan）

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、さらに一步進んで「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、バイオポリエステル分解酵素のハイスループットな人工進化システムの構築を行った。バイオポリエステル分解酵素の活性上昇を調べやすいように、本酵素を大腸菌表面に効率よく提示させる系を構築した。細胞表面上の酵素活性を調べたところ、本酵素は活性型として発現し良好な分解活性を有することが分かった。今後、本系を基盤とした分解酵素の人工進化実験を遂行し、酵素の高性能化を目指す予定である。

(5) 接着性生体分子の力学計測 (前田、尾笹)

生体分子は水溶液中でその形をさまざまに変化させ、その構造変化が機能発現に大きな影響を与えていると考えられる。本研究では、AFM (原子間力顕微鏡) を利用して生体分子の構造の変化を力学的に計測し、機能発現との関連性を解明することを目標としている。今年度は研究の準備段階として、AFM のカンチレバーと半導体表面との反発および吸着の状態が時間的にどのように計測できるのかをフォースカーブとサーマルスペクトルによって調べた。半導体表面を PEG (ポリエチレングリコール) 関連分子によって処理すると、液中計測でのフォースカーブに現れる反発と吸着の再現性が向上した。また、反発状態および吸着状態で停止させるとフォースカーブは揺らぎながら反発側へとシフトしていった。サーマルスペクトルには基板との相互作用によって低周波側に大きな変化が現れるが、反発状態と吸着状態の間の差はかなり小さいことがわかった。接着性生体分子である FN (フィブロネクチン) で処理した基板の表面を観察すると、FN 分子に対応する凹凸が見られたが、その表面において力学計測を安定して行うためには、吸着状態の再現性とカンチレバー表面の化学修飾を改善していく必要があることがわかった。

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 of DNA-polymer conjugates and its applications (Maeda, Takarada, Fujita, Pan, Ooi)

Single-stranded DNA (ssDNA)-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 structures and architectures via precise synthesis. In this year, we have synthesized the novel thermoresponsive

bioconjugates of ssDNA and poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) with tunable molecular architectures, i.e., DNA/PNIPAAm block and star-shaped copolymers, via atom transfer radical polymerization (ATRP) and click chemistry. The azido-functionalized linear and multi-armed PNIPAAm homopolymers with controlled molecular weights and narrow molecular weight distribution were first prepared from the azido-bearing initiators by ATRP. The alkyne-terminated ssDNA was attained through modifying the end-group of the commercially available 5' -amino-terminated ssDNA. Finally, the block and star-shaped copolymers with different lengths of PNIPAAm and DNA segments were prepared via the alkyne-azide cycloaddition reaction. The phase transition of PNIPAAm homopolymers and DNA/PNIPAAm copolymers were examined by high-sensitivity differential scanning calorimetry and ultraviolet-visible spectroscopy. The DNA-functionalized polymeric micelles were fabricated in aqueous media and their morphologies were investigated by dynamic light scattering.

(2) Non-crosslinking aggregation mechanism of DNA-linked nanoparticle (Maeda, Takarada, Fujita, Pan, Ooi, Katafuchi, Kobayashi N.)

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. We examined the non-crosslinking aggregation mechanism of these DNA conjugate materials using a solution small-angle X-ray scattering (SAXS). In the presence of NaCl, the gold particles with double-strand DNA aggregated with a structural order, and the neighboring particles overlap each other. The inter-particle distance between the gold particles varied with the length of DNA, and also with the graft density of DNA. Furthermore, it was found that the aggregation of the nanoparticles depends strongly on the core size. The results indicates that, at high salt concentrations, the colloidal stability is governed by the attraction of van der Waals between the core particles and the repulsions due to thermal fluctuation of DNA layer and overlapping of DNA molecules.

(3) Single-molecular imaging of DNA immobilized on substrates (Maeda, Ohshiro)

Since scanning tunneling microscopy (STM) can achieve high-resolution images that allow determination of molecular orientations and surface behaviors, STM imaging is one of the most promising methods for direct investigation of DNA molecules immobilized on surfaces. We succeeded for the first time in achieving single-molecule STM images of the DNA quadruplexes, such as i-motif and G-quartet, which are immobilized on gold substrates, and observed the pH dependent formation of the DNA quadruplex of i-motif. We also succeeded in achieving of the single-molecule STM images of the complexes of DNA and carbon nanotubes (CNT) in aqueous solution. These DNA imaging methods would be useful for DNA sequencing with nucleobase molecular tips.

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

There are disadvantages such as one-way control and low on/off ratio in the photoregulation method for functional nucleic acids by using azobenzene or cage compounds. Therefore, we thought that if the photoisomerization function was directly installed to a nucleobase instead of attaching a photochromic compound, it would lead to a more powerful photoswitching method. We have successfully developed several photochromic nucleobases (PCNs). PCNs contained in oligonucleotides showed very rapid and efficient reversible cis-trans photoisomerization, and such isomerization induced significant changes in the thermal stability of the duplexes and G-quadruplex aptamer. However, we have not achieved in vivo regulation because UV light that causes serious damage in biomolecules is needed by photoisomerization. Thus, we designed and synthesized azo-type photochromic nucleobase which is photoisomerized by visible light. Azo-type photochromic nucleobase showed very efficient and reversible photoisomerization without photolysis and any side reactions. But we need improvement of azo-type photochromic nucleobase because cis-form of azo-type photochromic nucleobase was thermally unstable.

2. Bioanalytical Systems Engineering

(1) Gene mutation assay by affinity capillary electrophoresis (Maeda, Takarada, Matsuoka, Tsukada,

Watanabe)

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 an affinity probe. The occurrence of point mutation is detected by observing two distinct peaks on the electropherogram, because the wild type of single-stranded DNA (ssDNA), which is complementary to PEG-*b*-DNA, migrates more slowly than its single-base-mutated ssDNA due to the complex formation. We have also designed a polyethylene glycol-peptide nucleic acid diblock copolymer (PEG-*b*-PNA) as a stronger affinity probe in order to separate folded sample ssDNAs. In this fiscal year, we demonstrated that PEG-*b*-DNA was able to work as an affinity probe in capillary zone electrophoresis. In addition, we synthesized PEG-*b*-PNA with different molecular weight, which was determined by size exclusion chromatography. Using the PEG-*b*-PNA probes, we tried to optimize the electrophoresis conditions including the probe concentration so as to separate folded sample ssDNAs at room temperature.

(2) Kinase activity measurement on a microchip (Maeda, Hosokawa, Han, Usuda)

We have been developing microchip-based phosphate-affinity electrophoresis (μ PAGE) for measurement of protein kinase activity. We already succeeded in measuring the activity of tyrosine kinase Src. In this year, μ PAGE has been applied to serine/threonine kinase PKA and casein kinase 2. By raising the concentration of phosphate-binding reagent in the microchannel, we have achieved comparable performance to that for Src. We have also succeeded in measuring the activity of tyrosine phosphatase LAR under similar conditions to those for Src.

(3) Microchip for cell pairing and fusion (Maeda, Hosokawa, Sasaki, Morisaki)

We have been developing a cell fusion method utilizing microstructures. We have developed a method to place two cells of different types in contact with each other through a microfabricated slit by fluidic pressure. By using the Sendai virus envelope method, we fused a mouse embryonic stem cell and a mouse somatic cell, while keeping the individual nuclei apart from each other.

(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 developed Yb and Er-doped yttrium oxide nanoparticles (Y₂O₃:YbEr-NP) that show NIR emission under NIR excitation. This NIR-NIR phosphor will be a powerful tool for imaging target molecule inside tissues.

(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 50nm was fabricated on a thin membrane made of SiN. After the membrane was set in an electrolyte aqueous solution, transmembrane current was recorded in response to the constant voltage applied across the membrane. Pulse-shaped current change was observed during translocation of a cylinder shaped molecule whose diameter is smaller, but comparable to the pore size. This is caused by a blockade of ionic current of electrolyte (e.g., potassium and chloride ions for KCl aqueous solution) by the molecule translocating the pore. We made a liquid cell in a Faraday cage, pico-ampere current amplifier, and observed blockade current due to the translocation of polyelectrolytes, such as DNA and polysaccharides. Using this device, molecular characteristics can be estimated, such as diameter corresponding to the amplitude of the current pulse, length of polymer, the pulse length, and so on.

3. Biomacromolecular Science

(1) Amyloid formation and molecular chaperone (Maeda, Zako, Sakono, Terada, Sörgjerd, Itoo)

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

Ahchaea induces a formation of soluble A β oligomer in vitro. We have also obtained similar results using eukaryotic prefoldin. Now we are investigating the effect of eukaryotic prefoldin on aggregation of other disease-related proteins.

(2) Structure and toxicity of Insulin amyloid (Maeda, Zako, Sakono, Kobayashi)

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. Our results using confirmation sensitive probes suggest that inner structure is different between fibrils and filaments. Now we are investigating another protein that is known to form filamentous amyloid.

(3) Adsorption mechanism of biopolyester-degrading enzyme (Maeda, Hiraishi, Okuma)

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 (PhaZRpiT1) 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. The results have suggested that the hydrophobic interaction between the amino acid residues at positions 441, 443, and 445 in the enzyme and the PHB surface plays a crucial role in facilitating the association phase of the enzyme adsorption process. In the present study, in order to improve PhaZRpiT1 for effective PHB degradation, we targeted Tyr at position 443 for substitution with a more highly hydrophobic amino acid residue. We designed a mutant enzyme with an amino acid substitution at this position, taking the following factors into consideration: (1) to achieve higher hydrophobicity than the original residue, (2) to retain the β -sheet structure, and (3) to change as little as possible the volume of the amino acid residue after the substitution. As a result, the substitution of Tyr443 with Phe was considered to be appropriate. Kinetic analysis of PHB degradation suggests that this amino acid substitution promoted not only the adsorption of the mutant enzyme to PHB, but also the disruption of the PHB surface to enhance the hydrolysis of the PHB polymer chain.

(4) Improvement of polyester-degrading enzyme for an effective recycle of biomass-based polyester (Maeda, Hiraishi, Tan)

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 (PhaZRpiT1). This new approach consists of [1] in vitro random mutagenesis and high-throughput screening of evolved enzymes with altered properties, and [2] functional analysis of the enzymes at nano-level. In this study, we constructed the screening system of the evolved PhaZRpiT1 using the expression system of the enzymes on the surface of E. coli. The enzymes expressed on the E. coli surface kept a p-nitrophenylbutyrate (PNPB) hydrolysis activity of normal level. Thus, we will establish an effective screening system of the evolved PhaZRpiT1 by combination of the present system and in vitro random mutagenesis in future plan.

(5) AFM analysis of adhesion-related bio-molecules (Maeda, Ozasa)

This research aims to clear the relation between the folding conformations of bio-molecules and the functions of the molecules, through measuring the force-deformation curve of a single bio-molecule by

AFM technique. In this year, we investigated the temporal evolution of repulsion and adhesion states between a soft cantilever and a semiconductor surface, by measuring the force curve and thermal spectrum in liquid. The improvement of reproduction of repulsion/adhesion states was resulted by the semiconductor surface modification with PEG molecules. The temporal evolution of force of fixed repulsion/adhesion states showed low frequency fluctuation together with shift toward the repulsion side. The interaction between the cantilever and the semiconductor surface resulted in a large change in the low frequency region of thermal spectrum, but the difference in thermal spectrum between repulsion and adhesion states was not large. The surface morphology of FN (fibronectin)-modified surface was measured with AFM, which suggests that the chemical modification of the cantilever will be the issue of further investigations.