

課題番号	LS072
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 23 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った新規1分子イメージング法の開発と生体分子観察への応用
研究機関・部局・職名	京都大学・物質—細胞統合システム拠点・教授
氏名	原田慶恵

1. 当該年度の研究目的

ダイヤモンドナノ粒子に内在する窒素—格子空隙中心(NVC)からの蛍光を検出するための蛍光顕微鏡システムの構築を行う。さらにNVCからの蛍光強度は磁場方位に依存するという特徴を利用して、粒子方位の精密計測を実現させるために、任意の方位に磁場を印可できる三軸磁場発生装置を実装すると共に、解析ソフトを開発する。さらに、高速計測によって収集された蛍光強度時系列データをリアルタイムで解析・モニターするシステムを開発し動態計測を実現させるための装置の構築に着手する。ダイヤモンド試料については、直径約20nmから50nm程度までの範囲で希望の直径のダイヤモンドナノ粒子を得るための調製工程を確立する。また、ダイヤモンド粒子を生体分子に特異的に結合させるための表面修飾法を検討する。

2. 研究の実施状況

5ms 毎の視野観察(40 μ m \times 40 μ m)と1 μ s 毎の蛍光強度高速計測を同時に実施できる1分子顕微鏡システムを構築した。開発した顕微鏡は、励起光と高周波の照射時間ならびにタイミングをナノ秒単位でパルス制御できる性能を持ち、2準位系として表現される電子スピンのエネルギーレベル占有度を正確にコントロールすることができる。従来の方法では励起光と高周波照射が定常的に行われていたために、この2準位系占有度は50%であった。本開発で励起光と高周波磁場のパルス照射を導入した結果、100%占有度の達成を光検出磁気共鳴観測を使った章動振動の観測によって確認できた。これは信号強度の倍増に成功したことを意味する。一方、蛍光プローブとして使用するダイヤモンドナノ粒子に内在する窒素—格子空隙中心(NVC)からの蛍光強度は磁場方位に依存するという特徴を利用して、粒子方位の精密計測を実現させるために、任意の方位に磁場を印可できる三軸磁場発生装置を実装すると共に(最大磁場強度3mT、方位変更レート1ms)、解析ソフトを開発した。孤立したダイヤモンドナノ粒子に対する準備実験では、最大誤差4°内で粒子方位を決定することができた。また、目的とする粒径を持つダイヤモンドナノ粒子を得るための調製工程とパラメータを検討した。その結果、ダイヤモンド粒子の懸濁液を適当な遠心力で適当な時間遠心することで、平均直径50nmから平均直径20nm程度までの範囲で希望の直径のダイヤモンドナノ粒子を調製することができるようになった。また、ダイヤモンド粒子を硝酸と硫酸の混液で処理することで、表面をカルボキシル基にする方法を確立した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 4 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件</p> <p>1. Katsunori Yogo, Taisaku Ogawa, Masahito Hayashi, Yoshie Harada, Takayuki Nishizaka and Kazuhiko Kinoshita Jr: Direct observation of strand passage by DNA-topoisomerase and its limited processivity. PLoS ONE 7 (2012) e34920. 10.1371/journal.pone.0034920 http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0034920</p> <p>2. Kohki Okabe, Noriko Inada, Chie Gota, Yoshie Harada, Takashi Funatsu and Seiichi Uchiyama: Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. Nature Communications 3, Article number: 705 (2012) 10.1038/ncomms1714 http://www.nature.com/ncomms/journal/v3/n2/full/ncomms1714.html</p> <p>3. Mami Nomura, Takeharu Nagai, Yoshie Harada and Tomomi Tani Facilitated intracellular transport of TrkA by an interaction with nerve growth factor. Developmental Neurobiology 2011 Jul; 71(7):634-49. 10.1002/dneu.20879 http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dneu.20879/abstract</p> <p>4. Kohki Okabe, Yoshie Harada, Junwei Zhang, Hisashi Tadokuma, Tokio Tani, and Takashi Funatsu: Real time monitoring of endogenous cytoplasmic mRNA using linear antisense 2' -O-methyl RNA probes in living cells. Nucleic Acids Research 39(4): e20 (2011) 10.1093/nar/gkq1196 http://nar.oxfordjournals.org/content/39/4/e20.full?sid=7754908e-6829-42da-8001-63a2484f7d62</p>
<p>会議発表 計 15 件</p>	<p>専門家向け 計 15 件</p> <p>1) 原田慶恵 蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った新規1分子イメージング法の開発 中央大学 生物物理学セミナー 第3回目 平成 23 年 6 月 7 日(火) 東京 中央大学工学部</p> <p>2) Yoshie Harada “Diamond particle probe for cell function analysis” Heidelberg-Kyoto Joint Symposium Crossing Boundaries: Stem Cells, Materials, and Mesoscopic Sciences 21-23 July 2011 Heidelberg, Germany (invited)</p> <p>3) Yoshie Harada “Development of a Novel Single-Molecule Imaging Technique Using Fluorescent Diamond Nanoparticles” Intergroup Seminars Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETH), Zurich Switzerland 25 July 2011 (oral)</p> <p>4) 原田慶恵「1分子イメージング顕微鏡の開発開始から20年」生物物理若手の会夏の学校 京都(招待講演)</p> <p>5) Yong-Woon Han, Ling-Chin Hwang, Anthony G. Vecchiarelli, Michiyo Mizuuchi, Barbara E. Funnell, Yoshie Harada, Kiyoshi Mizuuchi “Direct observation of P1 plasmid movement on an optical microscope” 第 49 回日本生物物理学会年会 2011.9.16-18 兵庫県立大学 姫路 (oral)</p> <p>6) Yuya Miyazono, Masayuki Endo, Takuya Ueda, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada, Hisashi Tadokuma “Constructing DNA-kinesin hybrid-nanomachine using the DNA-tile scaffold” 第 49 回日本生物物理学会年会 2011.9.16-18 兵庫県立大学 姫路 (oral)</p> <p>7) Takuma Iwasa, Yong-Woon Han, Hiroaki Yokota, Ryuji Yokokawa, Yoshie Harada “Single-molecule visualization of a AAA+ DNA recombination ATPase with zero-mode waveguides toward elucidation of its hexamer formation” 第 49 回日本生物物理学会年会 2011.9.16-18 兵庫県立大学 姫路 (oral & poster)</p> <p>8) 永井健治、原田慶恵 シンポジウム”1分子生物学と生化学の狭間に潜むナノシステム動作力学の理解を目指して”(オーガナイズ) 第 84 回日本生化学会大会 2011.9.21-24 京都</p> <p>9) 郷田千恵、岡部弘基、船津高志、内山聖一、原田慶恵 “生細胞の温度測定を可能にする蛍光性温度センサーの開発” 2011 年 第 1 回バイオ単分子・水和ナノ構造合同研究会 2011.9.22-23 箱根(口頭)</p> <p>10) Yoshie Harada “Fluorescent nanodiamonds for cell function analysis” The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest 2011.10.23-27 OIST Okinawa (invited)</p> <p>11) Yoshie Harada “Development of a novel single-molecule imaging technique using fluorescent diamond nanoparticles and its application to biomolecule observation” 17th International Biophysics Congress 2011.10.30-11.3 Beijing China (invited)</p>

様式19 別紙1

	<p>12) 韓龍雲、松本朋子、横田浩章、柏崎玄伍、森永浩伸、橋谷かおり、坂東俊和、杉山弘、原田慶恵 “DNA 塩基配列特異的に結合する小化合物 Pyrrole-Imidazole Polyamide における Pyrrole と Imidazole の構造学的特徴” 2012 年 生体運動研究合同班会議 2012.1.8 筑波大学 (口頭)</p> <p>13) Yoshie Harada: Studies on biomolecules using single-molecule imaging and manipulation techniques Asian Chemical Biology Initiative 2012 Hanoi Meeting 2012.2.26 Hanoi Deawoo Hotel (invited)</p> <p>14) 原田慶恵: 蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った新規1分子イメージング法の開発: 光・量子ビームによるナノダイナミクス応用技術調査専門委員会・研究会 2012. 3.4 愛媛大学(口頭)</p> <p>15) 原田慶恵: 1分子イメージング技術を使った生体分子機能解析: 第3回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム 2012.3.14 京都大学(招待講演)</p>
<p>図書</p> <p>計1件</p>	<p>原田慶恵、「一分子研究法」、生化学事典、朝倉書店 印刷中</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>1. サイエンスカフェ: アート、サウンド、サイエンスー「ちょっとブルブルしませんか？」平成23年6月4日(土)、京都 河原町 VOXビル、一般の大人対象、参加者30人 石の微粒子のブラウン運動の映像を鑑賞し、その動きについて議論し、ブラウン運動について理解を深める</p> <p>2. 平成23年京都大学愛媛講演会「生命とは何か～物質と細胞をつなぐ視点から～」にて「分子1個の動きを光学顕微鏡で見る」という演題で講演、平成23年9月18日(日)、愛媛県松山全日空ホテル、高校生を含む一般市民、参加人数300人</p> <p>3. 小中高向け授業・実習: 「女子中高生のための関西科学塾2012」で「DNAを顕微鏡で観察してみよう」という実習を行った、平成23年10月22日(土)、女子中高生対象、参加者8名</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	115,000,000	60,000,000	0	55,000,000	0
間接経費	34,500,000	18,000,000	0	16,500,000	0
合計	149,500,000	78,000,000	0	71,500,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	58,582,457	0	0	58,582,457	48,857,285	9,725,172	
間接経費	18,000,000	0	0	18,000,000	1,200,000	16,800,000	
合計	76,582,457	0	0	76,582,457	50,057,285	26,525,172	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	37,711,579	電動倒立顕微鏡、実験試薬、精密電力増幅器等
旅費	887,180	実験設備利用費(高崎量子応用研究所)等
謝金・人件費等	10,236,998	特定准教授人件費
その他	21,528	英文校閲利用料
直接経費計	48,857,285	
間接経費計	1,200,000	
合計	50,057,285	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
高周波発生器一式	N5183A・Agilent Technologies	1	3,230,745	3,230,745	2011/5/6	京都大学
パルスジェネレータ ー	575-8C セキテク トロン	1	976,500	976,500	2011/5/10	京都大学
電子増幅カメラ	DU860D-CS0- iXonX3	1	4,504,500	4,504,500	2011/5/27	京都大学
超小型全固体グ リーンレーザー	COHERENT社製	1	1,932,000	1,932,000	2011/5/30	京都大学
超高性能三次元空 気ばね式防振台	TDIS-20315LA(Y) ヘルツ社製	1	1,662,780	1,662,780	2011/6/7	京都大学
EO modulations system	ルミネックス社製	1	2,260,335	2,260,335	2011/6/22	京都大学
シングルフォトンカ ウンティングモ ー	SPCM-AQRH-16 セイコー・イー	1	1,953,105	1,953,105	2011/6/22	京都大学
FPGAシステム一式	ナショナルインス ツルメンツ社製	1	1,526,280	1,526,280	2011/9/2	京都大学
電動倒立顕微鏡一 式	エクリプスTi ニコ ン社製	1	7,574,700	7,574,700	2011/9/22	京都大学

三軸電磁石システム	TB-101208TDM テラベース社製	1	834,750	834,750	2011/11/30	京都大学
精密電力増幅器	4502 エヌエフ設計回路ブロック	3	678,300	2,034,900	2011/12/8	京都大学
倒立顕微鏡用XY自動ステージ	B105- 4051(TE2000. Ti)	1	2,419,200	2,419,200	2011/12/21	京都大学
多機能デジタルロックインアンプ	LI5640 エヌエフ設計回路ブロック	1	668,325	668,325	2012/2/10	京都大学