

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24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

市販のダイヤモンドナノ粒子にイオン注入を実施することによって NVC 量の増大を試み、直径 20nm のダイヤモンドナノ粒子に平均1個以上 NVC を含むような試料の調製を目指す。装置に関しては、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。タンパク質試料に結合したダイヤモンドナノ粒子の蛍光強度計測から、タンパク質分子の回転運動の有無ならびに揺らぎを含む系の周波数特性を明らかにし、生理学的意義を考察する。また、三軸磁場発生装置を使った異方的運動の可否についても計測を試みる。また、ダイヤモンド粒子と磁性ナノ粒子間の距離計測実験の準備を行う。

2. 研究の実施状況

ダイヤモンド内 NVC の磁気共鳴現象を蛍光強度として計測する新しい光検出磁気共鳴顕微鏡の開発、ならびに、NVC を含有するダイヤモンドナノ粒子の調製、タンパク質のダイヤモンド標識を実施した。

1. 平均粒径 26nm のダイヤモンドナノ粒子に、H、He、Li、N のイオン照射を実施した結果、 10^{13} He⁺イオン/cm²の注入量が、最も多くの NVC 内在ダイヤモンドナノ粒子を生成することが解った。
2. 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スペクトル解析・モニターするシステム開発に成功し、バンド幅 10kHz の性能を確認した。
3. ダイヤモンドナノ粒子の回転揺らぎの解析方法の検討では、三軸電磁石を使った3方位の磁場校正および、磁場制御ソフトの作成が終了した。さらに、シミュレーションによるデータ解析の手法の検証がほぼ終了し、磁場校正も最終段階となった。
4. ダイヤモンドナノ粒子と磁性ナノ粒子間の距離計測の準備実験として、三軸電磁石が発生する磁場方位と強度の細かな校正を実施した。
5. 三軸磁場発生装置を使い、細胞膜における異方的運動の計測を行った。
6. ダイヤモンド粒子を様々なタンパク質分子に標識する実験を行った。その過程で、ダイヤモンド粒子のタンパク質や細胞に対する非特異的な吸着が大きな問題となったが試行錯誤の結果、超分岐ポリグリセロールをダイヤモンド表面にコートすることで非特異的な吸着を劇的に低減させることを確認した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 6 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 micrometre processivity PLoS One. (2012)April; 7(4): e34920 2. Endo M, Tatsumi K, Terushima K, Katsuda Y, Hidaka K, Harada Y, Sugiyama H. : Direct Visualization of the Movement of a Single T7 RNA Polymerase and Transcription on a DNA Nanostructure. Angew Chem Int Ed Engl. (2012) Aug 27; 51(35) : 8778-8782. 3. Yong-Woon Han, Tomoko Matsumoto, Hiroaki Yokota, Gengo Kashiwazaki, Hironobu Morinaga, Kaori Hashiya, Toshikazu Bando, Yoshie Harada, and Hiroshi Sugiyama: Binding of hairpin pyrrole and imidazole polyamides to DNA: relationship between torsion angle and association rate constants. Nucleic. Acids Research (2012) Oct 4; 40: 11510-11517. 4. Ryuji Igarashi, Yohsuke Yoshinari, Hiroaki Yokota, Takuma Sugi, Fuminori Sugihara, Kazuhiro Ikeda, Hitoshi Sumiya, Shigenori Tsuji, Ikue Mori, Hidehito Tochio, Yoshie Harada, and Masahiro Shirakawa: Real-Time Background-Free Selective Imaging of Fluorescent Nanodiamonds in Vivo. Nano Letters (2012) Oct 15; 12: 5726-5732 5. Hiroaki Yokota, Yuko Ayabe Chujo, and Yoshie Harada: Single-Molecule Imaging of the Oligomer Formation of the Nonhexameric Escherichia coli UvrD Helicase. Biophysical Journal (2013) February; 104: 924-933. <p>(未掲載) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ling Chin Hwang, Anthony G Vecchiarelli, Yong-Woon Han, Michiyo Mizuuchi, Yoshie Harada, Barbara E Funnell and Kiyoshi Mizuuchi: ParA-mediated plasmid partition driven by protein pattern self-organization. EMBO J (2013)
<p>会議発表 計 26 件</p>	<p>専門家向け 計 26 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Yoshie Harada: “Development of a novel single-molecule imaging technique using fluorescent diamond nanoparticles” Crossing Boundaries: Stem cells, Materials, Mesoscopic Sciences and Beyond 2012. 4. 20-21 Peking University, Beijing China (招待講演) 2) 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 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会 2012.5.15 つくば国際会議場 (招待講演) 3) Kohki Okabe, Seiichi Uchiyama, Noriko Inada, Yoshie Harada, Takashi Funatsu: “Imaging of temperature distribution in living cells” Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 2012.5.29 Kobe (ポスター発表) 4) Yoshie Harada Development of a novel single-molecule imaging technique using fluorescent diamond nanoparticles Gordon Research Conferences Single Molecule Approaches to Biology 2012. 7. 15-20, Mount Snow Resort, West Dover, VT USA (ポスター発表) 5) Yong-Woon Han, Yoshie Harada “Characterization of protein-DNA complexes dynamics related to chromatin structure regulation using single-molecule techniques” 第 51 回日本生物物理学会年会 2012.9.22-24 名古屋大学 名古屋 (招待講演) 6) Hiroaki Yokota, Yoshie Harada “Single-molecule visualization of a non-hexameric helicase reveals active roles of its oligomeric forms in DNA unwinding” 第 51 回日本生物物理学会年会 2012.9.22-24 名古屋大学 名古屋 (口頭発表) 7) Yuya Miyazono, Masayuki Endo, Takuya Ueda, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada, Hisashi Tadakuma “Multiple kinesin molecules coordinate to ensure the long-distance walking: a DNA-kinesin hybrid nanomachine study” 第 51 回日本生物物理学会年会 2012.9.22-24 名古屋大学 名古屋 (ポスター発表) 8) Kohki Okabe, Seiichi Uchiyama, Noriko Inada, Yoshie Harada, Takashi Funatsu: “Imaging of temperature distribution in living cells” 第 51 回日本生物物理学会年会 2012.9.22-24 名古屋大学 名古屋 (口頭発表およびポスター発表) 9) Yoshitaka Shirasaki, Nanako Shimura, Nobutaka Suzuki, Kazushi Izawa, Asahi Nakahara, Mai Yamagishi, Yoshie Harada, Shuichi Shouji, Ryuta Nishikomori, Osamu Ohara “Live- cell secretion imaging assay of the inflammatory cytokine from human monocytes” 第 51 回日本生物物理学会年会 2012.9.22-24 名古屋大学 名古屋 (ポスター発表)

	<p>10) Takeya Masubuchi, Hisashi Tadakuma, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada, Takuya Ueda “Construction and functional analysis of DNA origami base DNA-RNAP hybrid nanostructure” 第 51 回日本生物物理学会年会 2012.9.22-24 名古屋大学 名古屋 (ポスター発表)</p> <p>11) 原田慶恵:1 分子イメージング技術を使ったタンパク質-DNA 複合体ダイナミクスの解析 2012 年度第 1 回バイオ単分子研究会 2012.10.5 中山平 宮城 (口頭発表)</p> <p>12) Yoshie Harada “Development of a novel single-molecule imaging technique using fluorescent diamond nanoparticles” Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking Academia Sinica, Taipei, Taiwan 2012.10.17-18 (ポスター発表)</p> <p>13) 原田慶恵:生体分子1個が働く様子を光学顕微鏡で見る 東北大学多元物質科学研究所セミナー 2012.12.3 (招待講演)</p> <p>14) 横田 浩章, 原田 慶恵:大腸菌非六量体型 DNA ヘリカーゼ UvrD は多量体で DNA を巻き戻す 分子生物学会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012.12.11(口頭発表)</p> <p>15) 横田 浩章, 原田 慶恵:大腸菌非六量体型 DNA ヘリカーゼ UvrD は多量体で DNA を巻き戻す 分子生物学会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012.12.11(ポスター発表)</p> <p>16) Mizuuchi Kiyoshi, Vecchiarelli Anthony, Hwang Ling Chin, Neuman Keir, Han Yong-Woon, Biesso Arianna, Ivanov Vassili, Harada Yoshie, Funnell Barbara:Plasmid partition and cell division control via ATP-driven protein distribution pattern self-organization on bacterial intracellular surfaces 分子生物学会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012.12.11(口頭発表)</p> <p>17) Mizuuchi Kiyoshi, Vecchiarelli Anthony, Hwang Ling Chin, Neuman Keir, Han Yong-Woon, Biesso Arianna, Ivanov Vassili, Harada Yoshie, Funnell Barbara:Plasmid partition and cell division control via ATP-driven protein distribution pattern self-organization on bacterial intracellular surfaces 分子生物学会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012.12.11(ポスター発表)</p> <p>18) 韓 龍雲, 横田 浩章, 松本 朋子, 森永 浩伸, 柏崎 玄伍, 橋谷 かおり, 坂東 俊和, 原田 慶恵, 杉山 弘:GCGC 配列を認識するヘアピン型ピロール-イミダゾールポリアミドの DNA に対する親和性はピロールをβ-アラニンに置換することで向上する 分子生物学会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012.12.11 (ポスター発表)</p> <p>19) 森 重之,五十嵐 龍治, 横田 浩章, 白川 昌宏, 吉成 洋祐, 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 分子生物学会福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012.12.3(ポスター発表)</p> <p>20) 横田浩章,原田慶恵:大腸菌非六量体型 DNA ヘリカーゼ UvrD の多量体形成の 1 分子イメージング 生体運動研究合同班会議 広島大学 2013.1.13(口頭発表)</p> <p>21) 韓龍雲,横田浩章,有吉真理子,岩佐拓磨,津中康央,平松 亮,小野輝男,横川隆司,原田慶恵:ナノ開口基板を用いた SRA ドメインのヘミメチル CpG 認識機構の解析 生体運動研究合同班会議 広島大学 2013.1.13(口頭発表)</p> <p>22) 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・第 2 回研究会 2013.1.22 ホテルエコノ福井駅前 福井(口頭発表)</p> <p>23) Yoshie Harada: Development of a novel single-molecule imaging technique using fluorescent diamond nanoparticles and its application to biomolecule observation Asian Chemical Biology Initiative 2013 Bangkok Meeting 2013.1.27 Pullman Bangkok Hotel G Bangkok, Thailand(口頭発表)</p> <p>24) Kohki Okabe, Seiichi Uchiyama, Noriko Inada, Yoshie Harada, Takashi Funatsu. Imaging of temperature distribution in a living cell The 2013 Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013.2.4 Philadelphia USA(口頭発表)</p> <p>25) Yong-Woon Han, Hiroaki Yokota, Mariko Ariyoshi, Yasuo Tsunaka, Takuma Iwasa, Ryuji Yokokawa, Ryo Hiramatsu, Daichi Chiba, Teruo Ono, Yoshie Harada Characterization of SRA-methylated DNA complexes dynamics related to chromatin structure regulation. The 2013 Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013.2.4 Philadelphia USA(ポスター発表)</p> <p>26) Yoshie Harada Development of a new fluorescence imaging technique using diamond nanoparticles. The 14th International Membrane Research Forum, 2013. 3.17 京都 (招待講演)</p>
<p>図 書 計 0 件</p>	

様式19 別紙1

産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	
国民との科 学・技術対話 の実施状況	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10名
新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

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	27,500,000	27,500,000	0
間接経費	34,500,000	18,000,000	8,250,000	8,250,000	0
合計	149,500,000	78,000,000	35,750,000	35,750,000	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	9,725,172	27,500,000	0	37,225,172	19,417,837	17,807,335	0
間接経費	16,800,000	8,250,000	0	25,050,000	2,670,925	22,379,075	0
合計	26,525,172	35,750,000	0	62,275,172	22,088,762	40,186,410	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	8,051,787	レーザ変調器、実験試薬、センサーチップ等
旅費	597,600	国内 研究打ち合わせ等(吉成)
謝金・人件費等	10,768,450	特定准教授人件費
その他	0	
直接経費計	19,417,837	
間接経費計	2,670,925	
合計	22,088,762	

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
LINOSレーザ変調器	LM13 P / QIOPTIQ PHOTONICS社製	1	1,109,850	1,109,850	2012/8/2	京都大学
LASER SYSTEM W ISOLATOR	TLB-6704-01 #TLB-6704-01 Newport社製	1	3,278,520	3,278,520	2012/10/30	京都大学
LINOSレーザ変調器	LM0202 P VIS KD*P / QIOPTIQ PHOTONICS社製	1	999,915	999,915	2013/2/19	京都大学