

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25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

良質のダイヤモンド粒子生成を行い、応用実験への展開を目指す。特に、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に再チャレンジし、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すると共に、生理学的意義を考察する。また、ダイア粒子と磁性ナノ粒子の距離決定に必要な信号位置の角度依存性測定を実証し、応用実験への展開を急ぐ。距離の具体的な数値を導出するとともに、昨年度に目標として掲げた「角度データを数分以内に取得」ならびに「リアルタイムの距離導出」へ再チャレンジする。

2. 研究の実施状況

1. 線虫腸管内のダイヤモンドの回転運動の検出に成功した。また、A431 細胞表面の EGF 受容体に抗体を介して結合させたダイヤモンド粒子の回転運動を解析を行った。EGF 処理は回転ゆらぎを減少し、細胞骨格であるアクチンフィラメントを破壊すると回転ゆらぎが増大する結果が得られた。これらの結果を基に論文を作成している。
2. 運動の異方性計測を実施するために、三軸電磁石を使って磁場方位高速スイッチングによる装置制御プログラムを完了させた。
3. 波長可変レーザを使った共鳴励起・放射を試み、出射光子数の増加が見込まれるかを検証した。また、試料に高周波を直接照射せずにレーザの位相変調を通して蛍光強度を変化させる、Coherent Population Trapping を試みた。装置制御プログラムは完成したが、共鳴励起は NVC が補足した電子を強制放出させてしまうこと、位相変調を実施する機材が高周波印加によって出力変化してしまうこと、などの理由で実証には至らなかった。前者に関しては短時間パルス照射の適応、後者は出力一定となるように入射時のレーザ強度に変調をかける、などで解決できる可能性が高い。
4. 高周波照射オフ時に導入可能な磁気共鳴パルスシーケンスを装置に組み込み、ミクロンサイズのダイア粒子内の ¹³C 原子核スピン計測を室温で試みた。配向した NVC 信号に対し 22kHz(静磁場 3mT 時)に信号が出現するようにパルス間隔 τ を約 23 μ s に設定したが、信号を観測するには至らなかった。より線幅の狭い、結晶性の高い NVC を使う必要がある。
5. Adamas Nanotechnologies 社から、NVC を含有し、表面にカルボキシル基を持つ直径 100nm と 40nm のダイヤモンド粒子を購入できるようになった。しかし、より小さなダイヤモンド粒子が必要である。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 5 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tsuyama T, Kishikawa J, Han YW, Harada Y, Tsubouchi A, Noji H, Kakizuka A, Yokoyama K, Uemura T and Imamura H : In vivo fluorescent adenosine 5'-triphosphate (ATP) imaging of Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures. Analytical Chemistry (2013) Aug: 85(16):7889-96: doi 10.1021/ac4015325. 2. Han YW, Kashiwazaki G, Morinaga H, Matsumoto T, Hashiya K, Bando T, Harada Y and Sugiyama H :Effect of single pyrrole replacement with β-alanine on DNA binding affinity and sequence specificity of hairpin pyrrole/imidazole polyamides targeting 5'-GCGC-3'. Bioorganic & Medicinal Chemistry (2013) Sep: 21(17):5436-41: doi 10.1016/j.bmc.2013.06.005. 3. Yong-Woon Han, Yasuo Tsunaka, Hiroaki Yokota, Tomoko Matsumoto, Gengo Kashiwazaki, Hironobu Morinaga, Kaori Hashiya, Toshikazu Bando, Hiroshi Sugiyama and Yoshie Harada :Construction and Characterization of Cy3- or Cy5-Conjugated Hairpin Pyrrole/Imidazole Polyamides binding to DNA in the Nucleosome. Biomaterials Science, (2013) Oct : 2 ,297-307 : doi 10.1039/C3BM60202H 4. Yohsuke Yoshinari, Ziya Kalay, and Yoshie Harada : Observing the rotational diffusion of nanodiamonds with arbitrary nitrogen vacancy center configurations. Phys. Rev. B, (2013) Dec: 88(23), [8 pages] : doi10.1103/PhysRevB.88.235206 <p>(未掲載) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yosuke Yoshinari, Shigeyuki Mori, Ryuji Igarashi, Takuma Sugi, Hiroaki Yokota, Kazuhiro Ikeda, Hitoshi Sumiya, Ikue Mori, Hidehito Tochio, Yoshie Harada, and Masahiro Shirakawa : Optically Detected Magnetic Resonance of Nanodiamonds in Vivo; Implementation of Selective Imaging and Fast Sampling. Journal of Nanoscience and Nanotechnology
<p>会議発表 計 24 件</p>	<p>専門家向け 計 24 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Yoshie Harada “Development of a New Fluorescence Imaging Technique Using Diamond Nanoparticles.” University System of Taiwan (UST)-iCeMS Joint Symposium, 2013.5.16 iCeMS, Kyoto (口頭発表) 2) Yoshie Harada “Development of a novel single-molecule imaging technique using fluorescent diamond nanoparticles.” 8th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium, 2013. 5.26-29 Jeju, Korea (招待講演) 3) Yohsuke Yoshinari, Shingo Sotoma, Yuta Kumiya, Takuma Sugi, Ryuji Igarashi, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, Yoshie Harada “Optically Detencted Magnetic Resonance for Fluorescent Single Nanodiamond in C.elegance” 新学術領域研究 少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求— 第五回領域会議 2013.6.15-16 琵琶湖クラブ 滋賀 (ポスター発表) 4) 原田慶恵「ナノ開口を使った DNA と DNA 結合タンパク質の相互作用の 1 分子観察」2013 年度第 1 回バイオ単分子研究会 2013.8.2 会津若松 (口頭発表) 5) Yoshie Harada “Development of a new single-molecule imaging technique using fluorescent diamond nanoparticles.” COLD SPRING HARBOR ASIA New Advances In Optical Imaging Of Live Cells And Organisms 2013.8.20-23 Suzhou, China (招待講演) 6) 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」:「生物医工学サロン」2013.9.4 京都大学再生医科学研究所 (招待講演) 7) Ryuji Igarashi, Yohsuke Yoshinari, Hiroaki Yokota, Masahiro Shirakawa and Yoshie Harada “Development of a new single-molecule imaging technique using fluorescent dia-mond nanoparticles and its application to bioimaging” 2013 JSAP-MRS Joint Symposia 2013.9.16-20 Kyoto Doshisha Univ. (招待講演) 8) Ryuji Igarashi, Yuta Kumiya, Takuma Sugi, Fuminori Sugihara, Hidehito Tochio, Yohsuke Yoshinari, Yoshie Harada and Masahiro Shirakawa “Optically detected magnetic resonance spectroscopy of nitrogen-vacancy centers for subnanoscopic measurement in vivo” 第 51 回日本生物物理学会 2013 10. 28-30 国立京都国際会館 (招待講演) 9) Yasuko Osakada and Yoshie Harada “X-ray excited optical luminescence via bio-molecule directed metal clusters.” 第 51 回日本生物物理学会 2013 10. 28-30 国立京都国際会館 (ポスター発表) 10) Hidenori Koizumi, Yasuko Osakada and Yoshie Harada “The localization of actin -related mRNAs in growth cone at a single molecule level” 第 51 回日本生物物理学会 2013 10. 28-30 国立京都国際会館 (ポスター発表) 11) Hiroaki Yokota, Daisuke Tone, Yong-Woon Han, Yoshie Harada and Kaoru Sugasawa “Single-molecule direct visualization of the mammalian nucleotide excision repair protein XPC.” 第 51 回日本生物物理学

様式19 別紙1

	<p>年会 2013 10. 28-30 国立京都国際会館 (ポスター発表)</p> <p>12) Yong-Woon Han, Hiroaki Yokota, Mariko Ariyoshi, Yasuo Tsunaka, Takuma Iwasa, Ryuji Yokokawa, Ryo Hiramatsu, Daichi Chiba, Teruo Ono and Yoshie Harada “Characterization of SRA-DNA complex using Zero mode waveguides” 第 51 回日本生物物理学年会 2013 10. 28-30 国立京都国際会館 (ポスター発表)</p> <p>13) Takuma Iwasa, Yong-Woon Han, Hiroaki Yokota, Ryuji Yokokawa, Ryo Hiramatsu, Teruo Ono and Yoshie Harada “Single-molecule visualization of RuvB oligomer for characterizing a AAA+ class hexameric ATPase with zero-mode waveguides” 第 51 回日本生物物理学年会 2013 10. 28-30 国立京都国際会館 (ポスター発表)</p> <p>14) Yohsuke Yoshinari, Yuta Kumiya, Takuma Sugi, Ryuji Igarashi, Shingo Sotoma, Masahiro Shirakawa and Yoshie Harada “Optically detected magnetic resonance for fluorescent single nanodiamond in cell and c. elegance.” 第 51 回日本生物物理学年会 2013 10. 28-30 国立京都国際会館 (ポスター発表)</p> <p>15) Takeya Masubuchi, Hisashi, Tadakuna, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada and Takuya Ueda “Construction and functional analysis of DNA origami base DNA-RNAP hybrid nanomachine” 第 51 回日本生物物理学年会 2013 10. 28-30 国立京都国際会館 (ポスター発表)</p> <p>16) Yoshie Harada “Optically Detected Magnetic Resonance of Nanodiamonds in vivo” UST-Kyoto University iCeMS International Symposium 2013.11.18-19 National Chiao Tung University, Hsinchu Taiwan (口頭発表)</p> <p>17) 原田慶恵 蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った生体分子イメージング法の開発 応用物理学会・量子エレクトロニクス研究会「バイオ・メディカルフォトンクス:基礎と応用の最前線」上智大学軽井沢セミナーハウス 2013.12.22 (招待講演)</p> <p>18) Yoshie Harada “Studies on Biomolecules using Single-Molecule Imaging Techniques” Kyoto University-University of Bristol Symposium Nanoscience: From high-speed AFM to 4π Holographic AFM 2014.1.10 iCeMS, Kyoto (招待講演)</p> <p>19) Yoshie Harada “Characterization of Protein-DNA complexes dynamics using Single-Molecule Imaging Techniques Asian Chemical Biology Initiative” 2014 Manila Meeting, 2014.1.25-27 Manila Philippines (口頭発表)</p> <p>20) Ling Chin Hwang, Anthony G. Vecchiarelli, Yong Woon Han, Michiyo Mizuuchi, Yoshie Harada, Barbara E. Funnell, Kiyoshi Mizuuchi “Para Protein Pattern Formation Drives Bacterial Plasmid Segregation” Biophysical Society 58th annual meeting 2014.2.15-19 San Francisco, CA (ポスター発表)</p> <p>21) Kohki Okabe, Yoshie Harada, Takashi Funatsu “Real-Time Monitoring of mRNA Decay in Living Cells” Biophysical Society 58th annual meeting 2014.2.15-19 San Francisco, CA (ポスター発表)</p> <p>22) Takuma Iwasa, Yong-Woon Han, Hiroaki Yokota, Ryuji Yokokawa, Teruo Ono, Ryo Hiramatsu, Yoshie Harada “Single-Molecule Visualization of Ruvb Origomer for Charactorizing a AAA+ Class Hexameric Atpase with Zero-Mode Waveguides” Biophysical Society 58th annual meeting 2014.2.15-19 San Francisco, CA (ポスター発表)</p> <p>23) Yong-Woon Han, Tomoko Matsumoto, Hiroaki Yokota, Yasuo Tsunaka, Gengo Kashiwazaki, Hironobu Morinaga, Kaori Hashiya, Toshikazu Bando, Hiroshi Sugiyama and Yoshie Harada “Construction and Characterization of Cy3- or Cy5-Conjugated Hairpin Pyrrole/Imidazole Polyamides Binding to DNA in the Nucleosome” Biophysical Society 58th annual meeting 2014.2.15-19 San Francisco, CA (ポスター発表)</p> <p>24) 吉成洋祐 蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った光検出磁気共鳴イメージング法と生体応用、第 61 回応用物理学会春季学術講演会 2014.3.18 青山学院大学相模原キャンパス (招待講演)</p>
<p>図書 計 1 件</p>	<p>原田慶恵 ダイヤモンドナノ粒子を使った新しい生体分子蛍光イメージング法の開発 現代化学 東京化学同人 No.511 2013 年 10 月 42-46 (2013)</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計 1 件</p>	<p>国際公開番号:W0 2014/058012 (国際公開日:2014 年 4 月 17 日 予定) 発明の名称:「ナノダイヤモンド粒子およびその製造方法、ならびに蛍光分子プローブおよびタンパク質の構造解析方法」 国際出願番号:PCT/JP2013/077591 (国際出願日:2013 年 10 月 10 日) 発明者:白川昌宏、外間進悟、五十嵐龍治、原田慶恵 出願人:独立行政法人科学技術振興機構</p>
<p>Webページ (URL)</p>	

様式19 別紙1

<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>「第8回女子中高生のための関西科学塾」の実行委員として、年間6回(プログラムA～F)のイベントを企画した。そのうち平成26年3月15日(土)16日(日)に1泊2日で行われたプログラムFにおいて、「DNAを顕微鏡で観察してみよう」という実習を担当した。また成果発表会のための実習結果のまとめの指導を行った。そのほか、父兄や教員とイベントの企画についての意見交換を目的とした交流会に参加した。実習参加者8名、関西科学塾全6回の参加延べ人数中学生319人、高校生261人、教員・父兄204人</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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す

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	87,500,000	27,500,000	0	0
間接経費	34,500,000	26,250,000	8,250,000	0	0
合計	149,500,000	113,750,000	35,750,000	0	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	17,807,335	27,500,000	0	45,307,335	45,307,335	0	0
間接経費	22,379,075	8,250,000	0	30,629,075	30,629,075	0	0
合計	40,186,410	35,750,000	0	75,936,410	75,936,410	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	22,838,959	バイオクリーンベンチ、電子増幅デジタルCCDカメラ、CWグリーンレーザー、倒立型リサーチ顕微鏡、実験試薬等
旅費	1,350,490	研究打ち合わせ、研究成果発表旅費等 (原田、吉成、韓)
謝金・人件費等	17,388,001	特定准教授人件費等
その他	3,729,885	PCバージョンアップ、Heイオン注入加工の請負、DNAシーケンサレーザー交換の請負、学会参加費、英文校正の請負等
直接経費計	45,307,335	
間接経費計	30,629,075	
合計	75,936,410	

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
バイオクリーンベンチ(強制循環排気式)	MCV-B91F パナソニックヘルス ケア社製	1	879,900	879,900	2013/7/2	京都大学
実験用試薬	蛍光ダイヤモンドナ ノ粒子 ND-NV- 100nm/100ml & ND-15NV- 40nm/10ml	1	675,601	675,601	2013/10/8	京都大学
対物レンズ100倍 (NA1.49)	UAPON100XOTI RF オリンパス社製	1	850,500	850,500	2013/12/13	京都大学
電子増幅デジタル CCDカメラ	DU-860D-CS0- #BV-IH アンドール・テクノ ロジーPLC社製	1	3,465,000	3,465,000	2014/1/9	京都大学
高機能交流安定化 電源	PCR500LE 菊水電子工業社	1	590,625	590,625	2013/12/26	京都大学

小型全固体CWグリーンレーザー	SapphireSF532-100 米国コヒレント社	1	1,147,125	1,147,125	2014/3/13	京都大学
倒立型リサーチ顕微鏡(2Deck)	IX83 オリンパス社製	1	3,666,600	3,666,600	2014/2/20	京都大学
微量高速遠心機、アングルローター	CF15RN, T15A41 日立工機製	1	779,100	779,100	2014/3/4	京都大学