

光ピンセットの研究

電気通信学研究科 量子・物質工学科専攻

清水和子研究室

0933023 澁川友美子

1 背景

光ピンセットとは、対物レンズで集光させた光が物体に照射したときに生じる放射圧によって、数十 μm までの大きさの微粒子を非破壊・非接触で捕捉し、自由に操作できるものである。この技術は、分子生物学、医学等の分野で、細胞等の生物試料に対して傷をつけることなく容易に操作できる手段として利用されている。

その1つとして我々はDNA分子の操作に着目した。DNAは高分子生体物質で生物細胞や組織をつくり上げるのに必要なすべての情報を蓄えている。光ピンセットを利用することによりDNA1分子の弾性応答の研究が可能になった。緩衝溶液中のDNAを引き伸ばす場合、力が2~3pN以下では力と伸びの関係は高分子鎖の形態を記述するモデルであるWorm-like chain (WLC みみず鎖)モデルやFreely Joint Chainモデルで記述できることが明らかにされている^[1,2]。光ピンセットだけでなく、微小磁石ビーズをDNAに接着し試料溶液セルの外部から磁石を用いて磁石ビーズを操作し弾性応答を調べることも行われている^[3]。

また、DNAは負電荷をもつ荷電高分子鎖であるため溶液のイオン強度によって形態が変化する。あるイオン強度の範囲では全長が数 μm 以上あるDNAが直径100nm以下のリング状に凝縮する。これはスーパーコイルと言われ、実際の細胞のサイズに収まるときの状態と思われる。イオン強度に対するDNA凝縮の様子はDNAを引き伸ばすときの力と伸びの関係から研究されている^[4-10]。

2 目的

今後DNAを光ピンセット操作の対象物とするため、試料作製技術を獲得し、標準的な緩衝溶液中DNAの弾性応答を測定してWLCモデルに当てはまることを確認する。また、リング状の強度分布をもつラゲールガウスモード光中にトラップされた微小球は、光の持つ角運動量のためリングに沿って回転運動を行う。これまでに我々の研究室では、ラゲールガウスビーム中の微粒子の回転実験を行っている^[11]。このことを利用してスーパーコイル状に凝縮したDNAをほどもく操作方法を開発する。

3 原理

3.1 光ピンセットの原理

屈折率 n_1 の媒質中を伝播する強度 I のレーザー光は運動量を持ち、この光が屈折率の異なる媒質(屈折率 n_2)に入射すると、境界面で反射と屈折が生じて光の進行方向が変化し、運動量に変化する。その際運動量保存則により光の運動量の変化分が境界面に生じる。この力を放射圧という。

レーザー光を溶液中の微粒子に照射すると、運動量の変化分は微粒子に受け渡され、それがレーザー光の焦点位置の方向に向かう力に変換される。図1のように粒子がBeam wasteより上側にあるとき、レーザー光の焦点位置の方向に向かう力と、光の進行方向に働く力とが釣り合って微粒子を焦点位置付近に捕捉することができる。

逆に、粒子がBeam wasteより下側にあると、

運動量変化によって生じる力は、光の進行方向に向かう力と同じ向きになり、全体に粒子を押し上げる力が強く働く。そのため、トラップすることは困難になる。

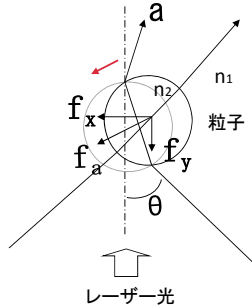


図1 光ピンセット原理

3.2 液体中を動く物体に働く抵抗力

空気中や水中を運動する物体は空気や水から抵抗力を受ける。しかし、粘性のない完全流体中を運動する物体、または完全流体の流れの中に置かれた物体はまったく抵抗を受けないことが導かれる。それゆえ抵抗のすべての原因は粘性にある。

流体中を運動する物体の受ける抵抗力はストークスの法則により、

$$F_{\text{visc}} = 6\pi\eta rv \quad (1)$$

と表される。ここで、 η は水の粘性、 r は物体の半径、 v は物体の運動速度である。

3 DNAの構造について

DNAはヌクレオチドという単量体(monomer)からできた重合体(polymer)で数億ヌクレオチドにもなる。この大きなDNAはたんぱく質と一緒にあって染色体を形成する^[12]。

実在の高分子鎖では、数多く連結した単結合の1つ1つが任意の回転角をとることができるため、同一のエネルギーをもつ高分子鎖であっても無数のコンフォメーションが考えられる。したがって、高分子鎖の形態を細かく表現することが困難であ

るため、鎖のひろがりやを両末端間ベクトル \vec{R} の二乗の時間平均値または集団平均値 $\langle \vec{R}^2 \rangle$ で評価する。ここで \vec{R} は両末端間距離(Mean square end-to-end distance)で、 $\langle \rangle$ は平均を意味する。高分子鎖の形態がランダムに変化する場合、 \vec{R} 自身の平均はゼロとなるため、有限の値をもつ二乗平均値を採用する。また、 \vec{R} の二乗は、自己ベクトルの内積 $\vec{R} \cdot \vec{R} = |\vec{R}|^2 = R^2$ で表されるため、ひろがりの程度がベクトルではなく数値で表現できる利点がある。

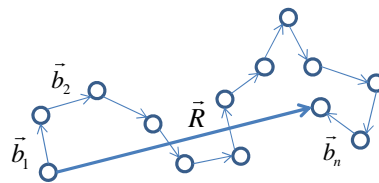


図2 両末端間距離

図2の定義を用いると $\langle \vec{R}^2 \rangle$ の計算式は以下のようまとめられる。

$$\begin{aligned} \langle R^2 \rangle &= \langle \vec{R} \cdot \vec{R} \rangle \\ &= \langle (\vec{b}_1 + \vec{b}_2 + \dots + \vec{b}_n) \cdot (\vec{b}_1 + \vec{b}_2 + \dots + \vec{b}_n) \rangle \\ &= \langle \vec{b}_1 \cdot \vec{b}_1 \rangle + \langle \vec{b}_1 \cdot \vec{b}_2 \rangle + \dots + \langle \vec{b}_n \cdot \vec{b}_{n-1} \rangle + \langle \vec{b}_n \cdot \vec{b}_n \rangle \\ &= \langle b_1^2 \rangle + \dots + \langle b_n^2 \rangle + 2 \langle \vec{b}_1 \cdot \vec{b}_2 \rangle + \langle \vec{b}_1 \cdot \vec{b}_3 \rangle + \dots + \langle \vec{b}_{n-1} \cdot \vec{b}_n \rangle \\ &= \sum_{i=1}^n \langle b_i^2 \rangle + 2 \sum_{i < j} \langle \vec{b}_i \cdot \vec{b}_j \rangle \end{aligned} \quad (2)$$

右辺第一項はボンドベクトルの長さの二乗平均の和で、高分子鎖の長さに関連した値である。第二項はボンドベクトルの間の角度の相関を表している。高分子鎖内のすべてのボンドベクトルの長さが等しく、方向が完全にランダムな場合(ランダム鎖)、第二項は0になる。また、図3に示すように結合角 $(\pi - \theta)$ で自由回転する高分子鎖の場合、右辺第二項は

$$\sum_{i < j} \langle \vec{b}_i \cdot \vec{b}_j \rangle = \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=1}^{n-1} \langle \vec{b}_i \cdot \vec{b}_{i+k} \rangle = b^2 \sum_{k=1}^{n-1} (n-k) \cos^k \theta \quad (3)$$

となり、 $\langle R^2 \rangle$ はnが大きいとき以下のように近似できる。

$$\langle R^2 \rangle = nb^2 \frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta} \quad (4)$$

結局、 $\langle R^2 \rangle$ の値は高分子鎖の長さと折れ曲がり具合に関する項の和で、空間的な広がり程度を表している^[13]。

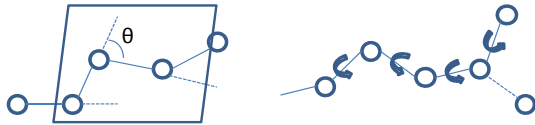


図3 自由回転鎖

DNA のらせん構造は半屈曲性鎖を表すモデルのみみず鎖(Worm-like chain)で表せる。これは、ある結合角で自由回転する場合の極限として定義される空間的に連続なモデルである。

結合の長さ b 、結合角 $(\pi - \theta)$ 、ボンド数 n の自由回転鎖を考える。この鎖の最初の結合方向への両末端間距離の射影の平均値 $\langle R_z \rangle$ は、 $n \rightarrow \infty$ の極限では

$$\lim \langle R_z \rangle = \frac{b(1 - (\cos \theta)^n)}{1 - \cos \theta} = \frac{b}{1 - \cos \theta} = P \quad (5)$$

となる。ここで、 P は持続長(Persistence length, P)と呼ばれ、あるコンフォメーションをとった鎖の中でほとんど曲がっていないとみなせる部分の長さである。高分子がこの長さの棒が繋がってできているということもできる。 P が長ければ長いほど鎖は固いことになる^[14]。

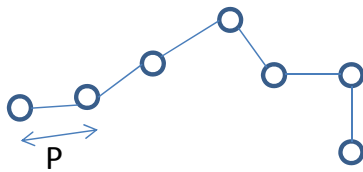


図4 高分子鎖

4 実験

4.1 DNA の弾性応答の測定方法

DNA の両端に球体のビーズを結合させ、そのビーズをレーザー光でトラップする。図5に方法を示す。

①ビーズをトラップした状態で片方を固定し、もう片方をDNAを引き伸ばす方向へ移動させる。

②レーザー光でDNAを引っ張る力よりDNAの弾性力の方が強くなると、ビーズがトラップから外れる。

③ビーズがトラップから外れたときのレーザーパワーとビーズ間の

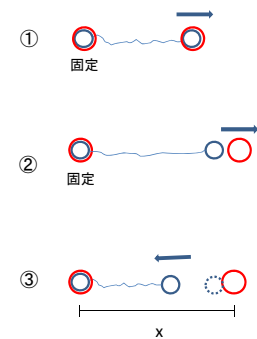


図5 測定方法

距離 x を測定する。

4.2 ビーズに働く力の測定

DNA の弾性応答を測定するために、まずはレーザー光によってビーズに働く力(DNA を引っ張る力)を測定する。

レーザー光によってトラップされたビーズを一定の速度 v で動かしたとする。 v が小さいときはビーズはトラップされたままレーザー光についていくが、 v が大きくなると液体からの抵抗力が大きくなりトラップから外れる。そのときレーザー光による力と液体からの抵抗力が等しくなると考え、そのときの速度 v をストークスの法則に代入し、ビーズに働く力を求めた。

4.2.1 ピエゾ素子の動作テスト

トラップが動く速度を操作するためにピエゾ素子を用いた。使用したピエゾ素子は最大駆動電圧150Vで作動距離 $18\mu\text{m}$ のものである。

ピエゾ素子の動作速度を算出するため、40Line/mm、スリット幅 $12.5\mu\text{m}$ の回折格子を用いて、ピエゾ素子を取り付けた対物レンズで集光された光が $12.5\mu\text{m}$ を通過する時間を測定した。

図6のように、ピエゾ素子を取り付けた20倍の対物レンズにHe-Neレーザーを入射させ、光が集光する位置に回折格子を設置した。回折格子のスリットを通過したレーザー光をフォトダイオードに

入射させその信号をオシロスコープで観測した。

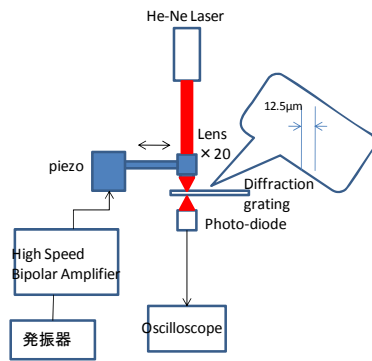


図 6 配置図

図 7 は 12.5 μm の距離を通過する光の通過時間から速度を計算し周波数との関係を表したグラフである。3 度の測定の平均を取った。直線の方程式は (6) である。

$$y=64.5x \quad (6)$$

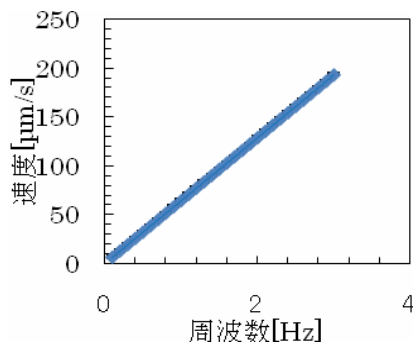


図 7 測定データの平均値

4.2.2 ビーズに働く力の測定

図 8 のように顕微鏡のステージ下の対物レンズにピエゾ素子を取り付け、電圧をかけて対物レンズが水平方向に動くようにした。レーザー光でビーズをトラップし、ピエゾに 150V 印加し、駆動周波数とレーザーパワーを変化させ、ビーズがトラップから外れるときの周波数を測定した。

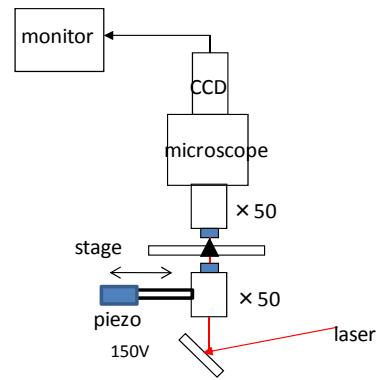


図 8 顕微鏡

4.2.3 測定結果、考察

1 μm と 2 μm のビーズがトラップから外れるときの周波数の値を(6)式に代入し、レーザーパワーと速度の関係に変換したグラフを図 9 に示す。それぞれの方程式は以下ようになった。ここで x はレーザーパワー[mW]、 y は速度[$\mu\text{m/s}$]である。

$$1\mu\text{m} \text{ ビーズ } y=16.7x \quad (7)$$

$$2\mu\text{m} \text{ ビーズ } y=19.0x \quad (8)$$

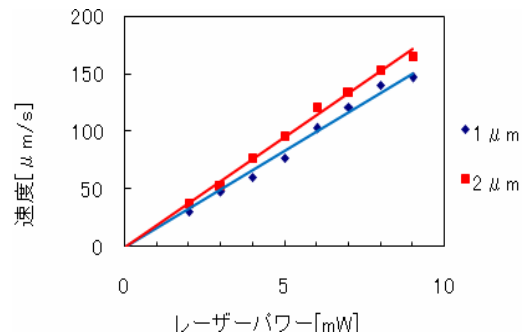


図 9 レーザーパワーと速度の関係

これよりストークスの法則(1)の速度 v に(7),(8)式から求まる速度 y の値を代入し、ビーズに働く力を求めた。その結果を図 10 に示す。ここで η は水温 20 $^{\circ}\text{C}$ での粘性係数 $1.0 \times 10^{-3} [\text{Pa} \cdot \text{s}]$ とした。

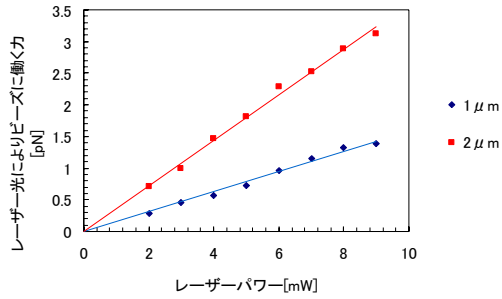


図 10 レーザー光によりビーズに働く力

図 10 の直線の方程式は

$$1\mu\text{m} \quad F=0.16x \quad (9)$$

$$2\mu\text{m} \quad F=0.36x \quad (10)$$

となる。ここで x はレーザーパワー[mW]、 F はビーズに働く力[pN]である。

図 9 から、 $1\mu\text{m}$ と $2\mu\text{m}$ では $2\mu\text{m}$ のビーズの方がレーザー光による捕捉力が強いことがわかる。これは、対物レンズにより集光されたレーザー光のビーム径とビーズのサイズとの差によってトラップの安定性が異なるためだと考える。

DNA の操作には $2\mu\text{m}$ のビーズを使用する。 $2\mu\text{m}$ のビーズにおける式(10)から、4.3 で述べる DNA 操作において DNA を引き伸ばすのに必要な力が求められる。

4.3 DNA の操作

4.3.1 試料の作り方

試料作製にあたり、緩衝液となる TE buffer と TE+BSA を作製した。TE buffer はあ Tris-HCl と EDTA からなる緩衝液で、2 価の金属イオンをキレートし、DNA の分解を防ぐ働きがある。

①ビーズの洗浄

Streptavidin でコートされたビーズを TE+BSA で洗浄した。

②ビーズと Biotin2 の結合

洗浄済みのビーズと Biotin2(Oligo 3bio2)を混合し、室温で 8 時間 incubate した後、TE+BSA を加えて

5 分間遠心した。

③λ-DNA と Biotin1 の結合

λ-DNA と Biotin1(Oligo 3bio1)と TE を混合し、 70°C で 10 分温めることで DNA の環状を切り、その後室温で 3 時間 incubate した。

④TE+BSA を緩衝液とし、①、②、③を混合して室温で 12 時間 incubate することで完成した。

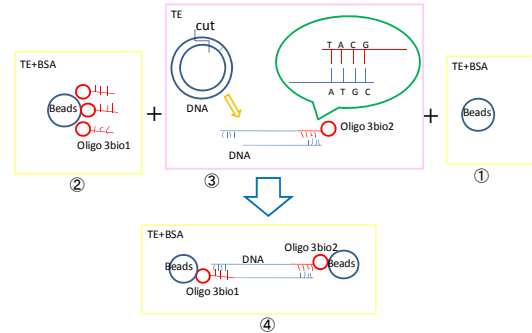


図 11 DNA の試料作製

4.3.3 測定結果

DNA の弾性応答を図 12 に示す。7 つのサンプルの測定データをまとめた。

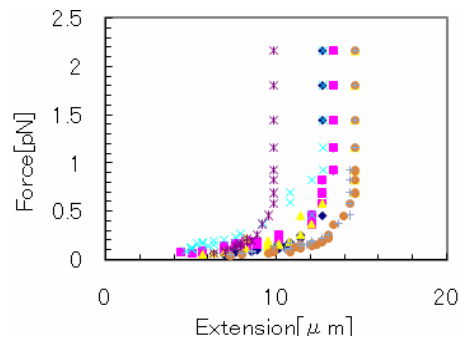


図 12 DNA の弾性応答

4.3.4 WLC モデルとのフィッティング

7 つのサンプルを WLC モデルとフィッティングした。フィッティングの様子は代表して 2 つ目のサンプルを図 13 に示した。P=50nm、L=15.5μm で測定値とほぼフィットした。

P の値は高分子によって異なり、DNA は約 50nm といわれている。この値を基準としてそれぞ

れの値を決めた。また、 L の値も今回用いた DNA の長さが 48000bp、約 16.5 μm であることから値を決めた。サンプル 6,7 は P の値が 100 となり基準値の約 2 倍となっていた。これは高分子鎖の本来回転するはずの結合部が固定され棒状とみなせる部分が 2 つくっついて 1 本の棒とみなされたためだと考えた。

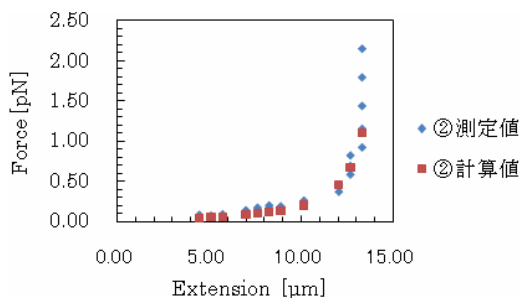


図 13 WLC とのフィッティング

5 まとめと今後の課題

DNA のらせん構造が WLC モデルで表せることを確認するため、光ピンセット技術を用いて DNA の弾性応答を測定した。結果から、DNA を引き伸ばすのに必要な力は数 pN ほどであった。今回の実験では 7 つのサンプルでの測定データをまとめたが、それ以外にも様々なサンプルを観測し測定を試みた。しかし測定途中で DNA が切れてしまったり、おそらく DNA が絡まってほとんど引き伸ばせなかったものも多かった。7 つのサンプルは全て DNA の両端にビーズが結合しており、ビーズがどちらもガラスに付着することなく液体中に浮遊していたものである。測定のためにはどちらのビーズもガラスに付着していないことが望ましい。それは、トラップされた 2 つのビーズと DNA をカバーガラスからの距離が等しい位置に固定できるからである。しかし、DNA の溶液を作製するごとに必ずこのようなサンプルが観測されるとは限らない。1 つも観測されたいこともあった。見えない DNA を探すことはとても根気のいる作業であっ

た。

DNA の弾性応答のグラフから、力が 1pN を超えてからは伸びは同じ値でありそれ以上は伸びなかった。もっとレーザーパワーを大きくすると更に伸び始めるということも実験的にわかっている。我々の今の実験系ではレーザーパワーを更に上げての測定は難しいが、光学系を工夫し行っていく。

今後は、ラゲールガウスモードを生成し、DNA のらせん構造の状態変化を観測するための実験を行う。

参考文献

- [1]M.D.Wang,H. Yin,R.Landick,J.Gelles,S.M.Block,Bio physicalJournal **72**,1335(1997)
- [2]StevenB.Smith,YujiaCui,CarlosBustamante, Science **271**,795,February(1996)
- [3]StevenB.Smith,LauraFinzi,CarlosBustamante, Science **258**,1122,November(1992)
- [4]T.R.Strick,J.-F.Allenmand,D.Bensimon,.Croquette, Biophysical Journal **74**,2016(1998)
- [5]T.R.Strick,V.Croquette,D.Bensimon,Nature **404**,901(2000)
- [6]V.A.Bloomfield, Biopolymers **44**,269(1997)
- [7]Yoshihiro Murayama, Masaki Sano, Journal of the Physical Society of Japan **70**, No.2,345,February(2001)
- [8]YoshihiroMurayama,Yoshihiko Sakamaki,Masaki Sano,Phys.Rev.Let **90**,N0.1,018102,January(2003)
- [9]Hirofumi Wada, Yoshihiro Murayama, Masaki Sano Phys.Rev.E **66**, 061912 (2002)
- [10]Y.Murayama,M.Sano,Biopolymers **77**,354(2005)
- [11]茂泉 純 修士論文 H.15 年度
- [13]野田春彦・丸山工作・石川 統 他著 分子細胞生物学 (上)