3I0945

位相差／蛍光デュアル顕微画像処理を組み込んだオンチップセルソータの開発

○高橋 一憲¹、服部 明弘¹、一木 隆範²、安田 賢二¹（¹ 東大院総合文化、² 東洋大学・工）

【目的】あらゆる細胞を特定の情報を基に一細胞レベルで選り分け、規格化した細胞ごとに培養を行う技術を確認することは、細胞株に依らない細胞系計測を立ち上げるためには必須の技術である。そこで我々は、微細加工によって作成した流路を流れる細胞を顕微鏡観察し、画像解析情報を基に直接選別するオンチップセルソータの開発を行ったので報告する。【システムの構成と特長】このセルソーター（CS）は、1心臓部であるCSチップ、2位相差／蛍光同時計測顕微鏡システム、3独自に作成した画像処理プログラムを組み込んだコンピュータおよび電場印加用電源より成る。CSチップは微細加工技術を用いて、高分子樹脂（PDMS）中に鋳型を用いて微細な流路（20～30 μ m）を形成し、これをガラス板と接着することで作製した。ガラス板の厚みは約200 μ mであり100倍の対物レンズも使用できるようになっている。そのため、高解像度で流路中を流れる細胞の微細構造を直接観察・識別することが可能である。ソーティングの手法は細胞が固有の電荷を持つことを利用し、画像解析結果に応じて必要なときにのみ電気的に力を作らせることで行った。電界を印加は必要のない細胞をドレイン用の流路に導くときのみ行うため、必要な細胞への損傷は最小限に抑えられる。ソーティングに必要な一連の作業はビデオレート（30m sec.）以下で行えるため、高速で流れてきた細胞群を素早く処理することができる。【結果】実際に、流速70 μ m/secで流路を流れる細胞をソーティングしたが、電気に対するレスポンスは非常に早く、十分高速処理が行えることを確認した。また、2種類の異なる蛍光を発現する大腸菌を用いて、これらが混在した細胞集団から各種類を正確に識別して、ソーティングすることに成功した。結果等詳しくは本会にて報告する。

K.Takahashi, A.Hattori, T.Ichiki, K.Yasuda : Development of on-chip cell sorter with phase contrast/fluorescence microscopic image processing

3I1015

位置制御型滑り力測定法の開発

○小嶋 寛明¹、Brenner Bernhard²、大岩 和弘¹（¹ 通総研・生体物性、² ハノーバー医大）

我々は、蛋白質フィラメントに沿ったモータ蛋白質の滑り力の分布を描き出すことにより、その力発生メカニズムを解明することを目指している。そのために、モータ蛋白質を固定した力測定用探針と蛋白質フィラメントとの相対位置をナノメートル精度で制御しながら、これらの間に発生する滑り力をピコニュートン精度で測定する手法の開発を行っている。これまでに、フィラメントを吸着した標本面に対して平行な力の成分を検出できるようにカンチレバー（ばね定数0.05pN/nm程度）を配置し、対物レンズから光の放射圧を与えることによって、探針位置のフィードバック制御を行う系の構築を行ってきた。このカンチレバーには、光の放射圧が有効に作用するように金属被膜を施していたが、光と金属被膜の相互作用により熱が発生し、カンチレバーがしばしば測定にとって無視できないほど変形することがあった。そこで今回は、この問題を解決するために、金属被膜を施さないガラス製のカンチレバーを用い、その界面における光の反射および屈折によって生じる運動量変化を利用して力を及ぼす手法を開発した。この手法により、熱発生によるカンチレバーの変形は、光の運動量変化によって生じる変位に比べて無視できるほど小さくなった。また、光源として500mWのYAGレーザとEOMを組み合わせたものを用いることにより、最大20 pNの力をカンチレバーに及ぼすことができること、フィードバック制御によりその位置を1.5 nm rmsの精度で制御できることが分かり、この手法が当初の目的にとって有効であることが示された。さらに、この実験系に全反射蛍光観察系を組み込むことにより、フィラメント像および探針先端の蛍光像の観察が可能であることを確認できたので、実際にモータ蛋白質—フィラメント間に生ずる滑り力を測定することが可能となった。

H.Kojima, B.Brenner and K.Oiwa : Development of position clamp nanometry

3I1000

光ピンセットが細胞に与えるダメージの定量的検討

○綾野 賢¹、山下 志乃舞²、若本 祐一²、安田 賢二²（¹ 東大・教養、² 東大院・総合文化）

【目的】光ピンセットは細胞やオルガネラなどの微小な生体物質を非接触にハンドリングするツールとして盛んに研究に用いられている。我々も光ピンセットを「オンチップ1細胞培養システム」において細胞を捕獲・運搬する手段として用いているが、1064nmYAG レーザーによる光ピンセットは大腸菌の鞭毛運動能やCHO細胞の分裂能にダメージを与えるという報告がなされており、実際に計測する細胞に光ピンセットを用いるためには、光ピンセットが与える細胞へのダメージの定量的見積もりが必要である。そこでモデル細胞として大腸菌を用いて、この成長・分裂能の変化から光ピンセットの細胞に与えるダメージを見積もった。

【方法】光ピンセットによるダメージの定量的な評価を行うため、大腸菌1細胞から生じた2つの娘細胞の一方のみにレーザーを照射し（CW条件）、レーザーを照射しないもう一方の娘細胞と成長速度・分裂周期を比較し、成長・分裂に影響を与えない照射条件を調べた。これは、姉妹細胞の分裂時間の相同性が非常に高いという我々の先行研究の結果を活用したものである。観察系には「オンチップ1細胞培養システム」を用い、微細加工技術によってスライドガラス上に作製した大きさ30 μ m×70 μ m、高さ5 μ mのマイクロチャンバ中に1細胞を閉じ込め、外部からの他の細胞の侵入なしに目的の細胞のみを同一顕微鏡視野内で3時間に渡り観察した。

【結果】様々なレーザー照射強度、照射時間で細胞をトラップしたところ、照射した全エネルギー量[＝（照射強度）×（照射時間）]のみによって細胞への影響は決定され、また、細胞への全照射エネルギーが0.6J以下の場合、姉妹間で成長・分裂に差は見られなかった。よってこの範囲内においては光ピンセットは顕著なダメージは与えないと考えられる。詳しくは本会にて報告する。

S. Ayano, S. Yamashita, Y. Wakamoto and K. Yasuda : Quantitative estimation of optical trap damage to cells

3I1030

1分子計測により示されたランダムコイルに起因するコネクチンSEK repeat領域のエントロピー弾性

○廣島 通夫^{1,2}、福沢 淳³、丸山 工作³、木村 澄子³、徳永 万喜洋^{1,2}（¹ 理研・免疫センター、² 遺伝研、³ 千葉大・理）

ザリガニハサミ筋のコネクチン分子には、脊椎動物にはない繰返し配列を持つ領域（SEK repeat）が存在している。サルコメアを用いた測定の結果、この領域はPEVKなど他の領域に比べ最も張力を発生する領域であることが分かっている。SEK領域の特性を詳細に調べるために、この領域のみから構成されたペプチド1分子について分子間力顕微鏡（IFM）を用いた伸長測定を行った。IFMは、高感度カンチレバーとレーザ光輻射圧によるプローブ位置の制御技術を備えた独自の力測定系である。伸長させる試料の長さをナノメートル精度で制御しながら、サブピコニュートンレベルの高分解能かつ数十pN以上のレンジに渡っての力測定が可能である。また、試料ペプチドはSEK領域の繰返し配列を十数個含み、両末端にGSTまたはビオチンが付加され、抗GST抗体を共有結合させた基盤とストレプトアビジン修飾したビオチン化プローブへの固定を可能としている。

1分子計測の結果、エントロピー弾性に由来すると考えられる張力が観察された。そこで、worm like chainモデルによるフィッティングをおこない、0.37nmのpersistence lengthを得た。この値はアミノ酸1個の主鎖方向の長さとはほぼ等しく、SEK領域が全長に渡ってランダムコイルであることを示唆している。SEK以外の領域については、脊椎動物のコネクチン分子について程度の差はあるが定まった構造が含まれることが分かっているほか、AFMを用いた測定もなされており、観察される張力が各領域ともSEK領域に比べ小さいことが示されている。これは上記のサルコメアでの測定において観察された結果とも一致している。これらから、全長に渡りランダムコイルであることがSEK領域の生体内での機能発現にとって重要であることが示唆された。これは定まった構造によりタンパク質の機能が決定されていない例を示した初めての結果といえる。

M.Hiroshima, A.Fukuzawa, K.Mariyama, S.Kimura and M.Tokunaga : Single molecule measurement reveals that entropic elasticity of SEK repeats of invertebrate connectin is caused by random coil