光ピンセット法とその応用

坪井 貴司^{1, 2)}, 寺川 進¹⁾

浜松医科大学光量子医学研究センター

〒431-3192 浜松市半田町3600番地

TEL 053-435-2092 FAX 053-435-292

Optical tweezer and its application

Takashi TSUBOI^{1, 2)} and Susumu TERAOKA¹⁾

1) Photon Medical Research Center, Hamamatsu University School of Medicine
3600 Handa, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192 JAPAN

2) Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science

要 旨

レーザー光を対物レンズを用いて集光すると、焦点付近で強い電場勾配が生じる。電場中に置かれた誘電体粒子には分極が誘導され、粒子は、電場の強い方向、すなわち焦点の方へ引き寄せられ、焦点付近で安定に捕捉される。このようなレーザーの応用は光ピンセット法と呼ばれ、これによってラテックス、シリカ、金などの微粒子の他、細胞や細胞内オルガネラなどを捕捉し、動かすことが可能である。ここでは、光ピンセットを簡単に実現する方法と、その基礎医学分野への応用について解説する。

キーワード：光ピンセット，赤外レーザー，ラテックスビーズ，細胞，1分子計測

Abstract

Optical trapping of dielectric particles with a single laser beam is called "optical tweezers". This technique is based on the concept of negative light pressure due to a gradient force. Trapping in water has been observed for macromolecules, colloids, biological particles and cells over the entire range of particle size from 10 μ m to 20nm. Application of this trapping method to cell physiology and cell biology is described.

Key words : Laser tweezers, infra-red laser, latex beads, cell, single molecule forceometry

1. はじめに

光ピンセット法は、レーザー光を高開口数の対物レンズで集光することにより、その焦点付近で物体を非接触に捕まえる手法である。この方法は、米国ベル研究所のAshkinによって、1986年に実用化された^{1, 2)}。ラテックスビーズをはじめウイルスから細胞まで、いろいろなものを捕まえることができる。波長約1 μm の赤外レーザーは水や生体物質に吸収されないので、これを用いれば溶液中の細胞などを生かしたまま捕捉し続けることができる³⁾。

なぜレーザー光で物を捕捉できるのか？捕まえる物の大きさが光の波長に近い場合、光線の屈折から光ピンセットの捕捉力を説明することができる。図1のように、焦点位置より少し遠方にラテックスビーズがある場合を考える。光は、ラテックスビーズに入るとき、出るときの2度屈折し、進行方向を変える。進行方向が変化することとは、つまり、光に運動量が与えられることである。この力の反作用として、同じ大きさの逆向きの運動量がラテックスビーズに与えられる。この力は、光の焦点方向へ向かう。そのため、ラテックスビーズを焦点面で捕まえることができるのである。

2. 実現方法

光ピンセットは、基本的にはどんな顕微鏡を用いてもできる。我々の研究室では、無限遠補正系(ICS)の対物レンズを持つ倒立顕微鏡(Olympus IX-70)を使用している。落射蛍光装置(水銀灯を差し込むポートの穴)からレーザー光を入れ、赤外用ダイクロイックミラーを使えば簡単に実現できる(図2)。透過光像、蛍光像ともに観察したい場合は、赤外用ダイクロイックミラーの他に蛍光用ダイクロイックミラーを組込むだけでよい。この方法以外に、カメラポートや接眼レンズポートからレーザー光を入射し、通常と逆の経路をたどって対物レンズから出させる方法もある。赤外レーザーの出力は、対物レンズ(約50%程度ロスする)や、ミラー(約5%程度ロスする)、ビー

図1 光ピンセット法による捕捉力

光の屈折の反作用としてレーザートラップの捕捉力を説明することができる。ラテックスビーズをレーザーの焦点の位置からどちらの方向に動かしても、常に焦点に引き戻すような力が働き、焦点の位置でラテックスビーズは安定して、捕捉される。

ムエキスパンダー(赤外レーザー用専用のものが売り出されているが、それでも、約0.5%程度ロスする)などを透過する際に低減するので、できるだけ大きな出力のレーザーを用いる方がよい。

対物レンズはなるべく開口数の大きなものを使用する。我々は主に、倍率100倍で開口数が1.40もしくは、1.65の油浸レンズ(Olympus)を使っている。しかし、油浸レンズの場合には、焦点を水中深くで結ばせるにつれ収差が大きくなるため、カバーガラスから遠い位置では捕捉力が弱くなってしまう。最も良いのは、水浸対物レンズを用いることである。水浸レンズならば(例えば60倍N.A.=1.2, Zeiss)カバーガラスからの距離に依存しないほぼ一定の力で物を捕捉することができる。

顕微鏡に入射するレーザー光は、レボルバーから出る時点の大きさで、丁度対物レンズの瞳の大きさ程度(対物レンズのおしりの穴の大きさ、100倍対物レンズの場合、約6 mm程度)に広げる必要がある。これよりもスポットが小さいとレン

図2 レーザートラップ装置の概略図

ビームエキスパンダー、あるいは、凸、凹レンズによって、対物レンズの瞳の径程度に広げた平行なレーザー光を対物レンズに入射させる。ビーズの動きは、微分干渉顕微鏡あるいは、位相差顕微鏡で測定する。

ズの開口を十分に使用していないことになり、捕捉効率が悪くなる。また、これよりも大きいと、光のロスが多くなる。

赤外光は目では見えないので、赤外のレーザー光を使って光軸を合わせるのは非常に困難である。そこで、赤外線に感度のあるCCDカメラや、赤外センサーシートと呼ばれるものを使うとスポットの位置がわかるようになる。レーザーのスポットが顕微鏡視野の中央に来るように光学系の調整をしたら、水中に置いたビーズを実際にトラップしてみる。通常光による明視野観察をしながら、ビーズが特定の方向に流れていくのではなく、ビーズを真上に（対物レンズから遠のく方向に）押し上げる力が出るようにレーザーの傾きを調整する。その後、捕捉されたビーズが明視野観察でピントが正確に合う位置に来るように、レーザーの収束点を補助の凸レンズの位置を動かして調整する。

3. 捕捉力の較正法

光ピンセットの捕捉力を知る方法としてよく用いられているのは、流体力学的な力と比較する方法である。流体中の静止球体には、ストークスの

法則により $6\pi\eta rv$ (η : 粘度, r : 球体の半径, v : 流速) の抵抗力が働く。粘度 (η) の分かっている溶液と、半径 (r) の分かっているビーズとを用いれば、流速 (v) を測定することで捕捉力を求められる。顕微鏡のステージを動かして水流を作れば、ビーズが捕捉（トラップ）から外れた直後のステージの移動速度を流速と近似することにより、捕捉力を計算できる。波長1064nmの赤外レーザーを用いて数 μm のビーズを捕捉した時の最大捕捉力は、理論的にも実験的にも 1 pN/mW程度である。

4. 分子、細胞への応用例

光ピンセット法は、トラップする対象によりいろいろな応用ができる。例えば、バクテリアの鞭毛モーターの回転トルクの測定に利用された。鞭毛の直径は非常に小さく（約20nm）、光ピンセットによる直接的な捕捉は非常に難しいので、まず鞭毛をガラスの上に固定する。すると、鞭毛がガラスに固定されたバクテリアはその本体の方が回り始める。そこでバクテリア本体を光ピンセットで捕捉し、捕捉するのに必要な光圧から、逆に鞭毛の回転トルクが測定された¹⁾。

図3 アクトミオシンモーターが発生する力の測定

ミオシンはカバーガラス上に低密度で接着させる。アクチンフィラメントは蛍光顕微鏡で可視化するためにファロイジンローダミンで蛍光染色している。アクチンフィラメント後端に結合したゲルゾリンコートビーズの位置を位相差顕微鏡によって測定する。

宮田らによって、光ピンセット法で、アクトミオシンモーターの動作が解析された。アクトミオシンモーターの基本的動作は、ミオシンがATPを加水分解してアクチンフィラメントを引っ張ることだと考えられている。非常に低密度でガラスに接着させたミオシン分子とアクチンフィラメントをナノmol濃度のATP存在下で相互作用させることにより、ミオシン1分子がATP1分子を加水分解したときにどれだけの力が発生し、どれだけ動くのかを測定した(図3)。ミリmol濃度のATPが存在する生体内とは異なり、このような実験条件でミオシンが仕事をするのは、時折拡散でやってくるATPを分解する時だと考えられる。アクチンフィラメントの後端にはゲルゾリンでコートした直径1 μm 程度のラテックスビーズを結合させた。このビーズは、アクチンフィラメントを操作するハンドルとして使用し、またアクチンフィラメントの動きを測定するための目印とした。ビーズを光ピンセットで捕捉し、そのブラウン運動を抑制する。ミオシンがアクチンフィラメントを引っ張ればビーズが動くはずである。

ビーズの動きをナノメートルの精度で測定したところ、時折新しい位置に移動して、しばらくすると別の位置に移動するのがみられた。ATP濃度を数百ナノmolにするとさらに運動は頻繁になる。ATPの濃度、あるいは、光ピンセットの捕捉力を変えて実験した結果、これらのパラメーターによらず、ミオシンはアクチンをある一定の大きさ(約8 nm)だけ動かすことが分かった。またその時に発生する力は、5~6 pNであった⁵⁾。

細胞膜にある受容体や接着タンパク、あるいは抗原分子などは選択的に結合するリガンド分子がある。ビーズにそれらのリガンドのひとつを結合させて、これを細胞膜上の分子と結合させることができる。すると、ビーズをトラップすることによって、細胞膜上の分子を膜に沿って側方に引っ張ることができる。楠見らはこのような方法で、膜上のトランスフェリン受容体やカドヘリンなどが大きさが約1 μm の囲いの中に存在することを示した。囲いを乗り越えるのには強い引っ張り力が必要で、これらの膜分子の膜内での移動は細胞骨格系による網構造によって動きが制限されてい

図4 開口放出反応時の水噴出の測定

上: アドレナリン分泌細胞(クロマフィン細胞)の上に捕捉したビーズの微分干渉顕微鏡像。下: ビーズの z 軸方向の動き。縦軸は微分干渉像での明るさで、対物レンズの焦点からの位置に応じて変化する。横軸は時間。矢印は、電気刺激を与えた時刻を示す。電気刺激を与えた直後からビーズがパルス状に動くのがわかる。

ることがわかった^{8, 9)}。

神経伝達物質やホルモンの放出は、分泌顆粒が細胞膜と融合し、その内容物を細胞外へ放出するという、開口放出反応によって起こる。しかし、開口放出反応時の実際の物質の移動や拡がり方については、分かっていないことが多い。そこで我々は、内容物の放出が、単純な拡散によるものか、あるいは能動的な放出によるものかを明らかにするために、カテコールアミンを放出する副腎髄質クロマフィン細胞の細胞膜近傍に、光ピンセットでトラップしたビーズ(直径約 $1\ \mu\text{m}$)の動態を観察することによって解析を試みた。捕捉したビーズの動きは、微分干渉顕微鏡の光学系を

用いて測定した。光ピンセット法で細胞膜近傍の水中にビーズをトラップすると、わずかにブラウン運動の影響を受けながらも安定した状態となった。電気刺激により細胞に開口放出反応を引き起こさせると、開口放出反応と同じ頻度でビーズがわずかに動くことが分かった(図4)。この反応は、開口放出反応を不可逆的に抑制するボツリヌス毒素で完全に抑制された。したがって、観察されたわずかなビーズの動きは、開口放出反応によって引き起こされたものと結論できる。ビーズは細胞には直接触れていないので、ビーズの受けた力は細胞に由来する水の噴出によるものと考えられる。以上のことから、顆粒内容物の放出は単純な拡散ではなく、能動的な放出によるものであり、開口放出反応時には、融合孔から短い水噴出がパルス状に起ることが明らかになった。

5. おわりに

ここに紹介した光ピンセット法は、電気生理学的な測定や微分干渉法あるいは蛍光顕微鏡法と組み合わせる自由度が高い。光ピンセット法を用いることにより、特定の蛋白質分子や細胞を観察して、さらに動かしてみることができるようになる。つまり、光ピンセットの利用により、系に攪乱を加え、それに対する応答を観察すること、相互作用の力を直接測定すること、が可能になったわけである。この方法は、抗原と抗体、基質と酵素、リガンドと受容体との相互作用などあらゆる生体物質の1分子レベルでの機能解明に大いに貢献するものとして期待される。

文献

- 1) Askin, A. and Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E. and Chu, S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, 11, 288-290 (1986)
- 2) Askin, A. Trapping of atoms by resonance pressure. *Biophys. J.*, 61, 569-582 (1992)
- 3) Svoboda, K. and Block, S. M. Biological application of optical force. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 247-285 (1994)
- 4) Steven, M. Block, D. F., and Howard C. B.

- Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers. *Nature*, 338, 514-518 (1989)
- 5) Miyata, H et. al. Stepwise motion of an actin filament over a small number heavy mero-myosin molecules is revealed in an in vitro motility assay. *J. Biochem.*, 115, 644-647 (1994)
- 6) Nishizaka, T et. al. Unbinding force of a single motor molecule of muscle measured using optical tweezers. *Nature*, 377, 251-254 (1995)
- 7) Miyata, H. Yasuda, R. and Kinoshita, K. Jr. Strength and lifetime of the bond between actin and skeletal muscle α -actinin studied with an optical trapping technique. *Biochem. Biophys. Acta*, 1290, 83-88 (1996)
- 8) Kusumi, A. Sako, Y. Fujiwara, T. and Tomishige, M Application of laser tweezers to studies of the fences and tethers of the membrane skeleton that regulate the movements of plasma membrane proteins. *Methods in Cell Biol.* 55, 713-94, (1998)
- 9) Sako, Y. Nagafuchi, A. Tsukita, S. Takeichi, M and Kusumi, A. Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin of the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 140, 1227-40 (1998)