レーザトラップされた感熱性ゲルによる DNA 分子のマニピュレーション*

新井 史人^{*1}, 吉川 慶一^{*2}, 市川 明彦^{*2}
丸山 央峰^{*2}, 福田 敏男^{*1}

Manipulation of DNA Molecules by Laser Trapped Thermoreversible Hydrogel

Fumihito ARAI^{*3}, Keiichi YOSHIKAWA, Akihiko ICHIKAWA,
Hisataka MARUYAMA and Toshio FUKUDA

^{*3} Department of Micro-Nano Systems Engineering, Nagoya University,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi, 460-8603 Japan

We have developed a novel method of manipulating DNA molecules in liquid by laser. At first, we propose in-situ formation of gel microbead made of the thermoreversible hydrogel. Irradiation of a 1064 nm laser to the aqueous solution mixed with poly-(N-isopropylacrylamide) through a high magnification lens resulted in formation of the gel microbead at the laser focus by heating. Next, we propose to manipulate DNA molecules by the gel microbead, which is trapped and manipulated by the laser scanning. The technique allows DNA molecules to be manipulated at any point without the need of prior chemical modification of the microbead. We investigated characteristics of gel microbead formation by laser irradiation. We succeeded in manipulation of DNA molecules in high speed.

Key Words: Micromanipulation, Laser Trap, Optical Tweezers, Laser Scanning, Thermoreversible Hydrogel, DNA

1 序論

近年の走査プローブ顕微鏡や蛍光による1分子観察技術の進展に伴って、DNAの形態、挙動またはDNAとタンパク質との相互作用を1分子レベルで観測することが可能になってきている^{①②}。生体分子1分子を対象とした操作・計測を行うことにより、平均値ではない個々の分子の状況を計測することが可能になることが期待される。このような1分子レベルの解析を効率的に行うためには、マニピュレーション技術により観測対象となる分子を顕微鏡視野内の適当な位置に操作する必要があるため、DNA分子を対象としたマニピュレーション技術の開発が強く求められている。

我々は、マニピュレーション技術としてレーザトラップの研究を行ってきた^{③④}。レーザトラップにより非接触で微粒子のマニピュレーションが可能であるが、通常のランダムコイル構造のDNA分子は物質密度が低いため、トラップ力は極めて小さく、DNA分子を直接操作することは困難であった。従来、この手法によりDNA分子を操作するにはマイクロサイズのビーズにDNA分子の片側もしくは両側を化学的に結合させてビーズをレーザトラップや磁力により操作する方法が用いられてきた^{⑤⑥}。しかし、この手法ではDNAに前もって化学的処理を施す必要があり、手間がかかる。また比較的長いDNAを操作する場合には、化学結合用に末端を修飾することが困難であるため、未修飾の状態で作動できる技術が求められてきた。

最近では、DNA分子はPEG (Polyethylene Glycol) や低分子カオチンなどを一定濃度以上にとると、ランダムコイルからグロビュール構造と呼ばれる凝縮構造に相転移させることが可能で、これを直接的にレーザトラップできることが実験的に確認された^⑦。しかしながら、この手法ではひも状でDNAを操作できない欠

* 原稿受付 2005年3月22日。

^{*1} 正員、名古屋大学大学院工学研究科(〒464-8603 名古屋千種区不老町1)。

^{*2} 名古屋大学大学院工学研究科。

E-mail: arai@mein.nagoya-u.ac.jp

点がある。他のレーザートラップの方法として DNA 溶液中に 200 nm のラテックス粒子を入れておくものがある。レーザーの焦点付近に数 10 個のラテックス粒子がトラップされ、これが DNA 分子を包みこむため DNA 分子をひも状で操作できる⁽¹⁰⁾。しかし、この操作手法では、ブラウン運動する粒子を安定にトラップするために高いレーザー出力が必要で、また高速搬送はできない。

本論文では、環境温度によりゾル・ゲル相転移する熱ゲル化物質を用い、DNA 分子を安定に間接操作する新しい操作手法を提案する。この操作手法は、レーザーによる直接操作が困難なひも状の DNA 分子に対して、化学的に修飾することなく、比較的低いレーザー出力で高速搬送が可能という点で優れているといえる。

2 レーザトラップ

レーザートラップの原理^{(11) (12)}について説明する。対物レンズでレーザー光を集光し微粒子に入射すると、図 1 に示したように、環境と対象物の屈折率の違いによってレーザーの方向が変化する。このとき発生するフォトンの運動量変化はその屈折面に対し反作用として放射圧を生じさせる。その総和は微粒子の屈折率が媒質よりも大きい場合、レーザー光の焦点位置 O' へ向かう方向となる。これにより微小物体を捕捉することが可能である。

Fig. 1 Model of laser trap

3. 同期型レーザーマイクロマニピュレーション

高速に一本のレーザーをスキャンすることによって離れた複数の点を時分割でレーザートラップし、さらにそれらの点を適切な速度によって個々に同期させて動かすことにより、複数の対象物を個々の軌道に沿って搬送することができる。これを“同期型レーザーマイクロマニピュレーション (Synchronized Laser Micromanipulation: SLM)”と呼んでいる⁽⁴⁾⁽⁶⁾。図 2、図 3 に SLM の原理の概略図を示す。これにより一本のレーザーで複数の対象物を操作できるため、システム

が簡素化される。また複数の対象物の操作による協調作業が可能のため、より高度なマニピュレーションが可能となる。SLM の応用例として、微生物の回転や付着性ビーズの組み立てなどが可能であり⁽⁶⁾、対象物を安定かつ高度に操作できる。

Fig. 2 Comparison of laser scanning micromanipulation and SLM

Fig. 3 Laser scanning pattern for multiple targets

4. 熱ゲルツール

Poly-(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) 10w% 水溶液は約 32℃ でゲル化する。これまで近赤外レーザーを照射してゲルの微粒子を作製した研究が行われている⁽¹³⁾。波長 1064 nm のレーザーをこの水溶液に照射すると、図 4 に示すようにレーザー焦点付近の数ミクロンのみをゲル化させることが可能で、このマイクロサイズのゲル粒子はレーザーによりトラップして操作することが可能である⁽¹³⁾。ここで、ゲル化するかわり加熱を行いつつ、できたゲルをレーザートラップするにはレーザーの波長が影響するが、本論文では入手しやすい 1064nm のレーザーを利用する。我々は生成したゲルに対象物を付着させて間接的に操作する手法を提案した⁽¹⁴⁾。ここではこのゲルを熱ゲルツールと呼ぶことにする。この手法の利点として、1. ツールをガラスチップのような閉空間で作成可能であり、ツールを新たに投入する必要が無いこと、2. ゲルには付着性があり、これによりツールに微生物を付着させることで微生物搬送が容易に

なること、3. レーザ照射を止めることでゲルツールが溶化し細胞をリリースすることが可能であることが挙げられる。本手法は同期型レーザマイクロマニピュレーションにより、レーザをスキャンすることで図5に示したように、複数の熱ゲルツールを作成することができる。本論文では、この熱ゲルツールに DNA を付着させることで安定に間接操作する手法を提案する。

Fig. 4 Concept of gel microtool

Fig. 5 Generation of multiple hydrogels by SLM

5. 実験システム

本研究で用いたシステムを図6に示す。熱ゲルツールの観察には、NA 1.35, 100 倍の油浸対物レンズを組み込んだ倒立顕微鏡で明視野観察を行う。照明にはハロゲン光源を用いた。

一方、DNA 分子の観察は蛍光観察にて行う。励起光の光源には水銀ランプを用いており、水銀ランプからの光に対してミラーユニット (U-MNIBA2, オリンパス) にて波長領域 470-490 nm を選択し、これをステージ上の対象物に照射し、蛍光を観察する。蛍光の特色は、ほとんどの物質は強い蛍光を出さないの、検出のバックグラウンドノイズが低く、高感度の測定ができることである。また、DNA の蛍光強度は微弱なため、SIT カメラで観察する。熱ゲルツールの作成及び、操作

のためのレーザには Nd: YVO₄ laser (1064 nm, continuous wave, Max: 4.98 W) を用いる。また、ガルバノミラーの角度を DC モーターで制御することで、レーザを観察面において 2 次元走査することができる。X-Y-Z ステージはステッピングモータにより制御する。

Fig. 6 Schematic diagram of optics for laser micromanipulation

6. DNA の試薬および熱ゲルツールの作成

DNA は明視野観察では直接観察できないため、前もって蛍光染色する必要がある。本論文では、感度が高い YOYO-1 (励起波長 488 nm, 励起波長 510 nm) を蛍光標識として用いた⁽¹⁵⁾。YOYO-1 は、DNA の二重らせんにインターカレートすることにより、DNA が存在する部分に高濃度に集積する。DNA にインターカレートした YOYO-1 分子は、DNA が吸収した紫外線 (260 nm) のエネルギー転移、もしくは自身の吸収光により励起され、蛍光を発する。この蛍光強度は DNA 量に比例するので、蛍光強度を測定することで DNA を定量することが可能である。また、DNA 分子として大きさ 166 kbps の T4GT7(NIPPON GENE CO.LTD.)を用いた。光化学反応による DNA の切断などを防ぐために溶液から溶存酸素を取り除く必要があり、退色防止剤として 4% 程度のメルカプトエタノールを混ぜた⁽¹⁶⁾。

溶液中で作成した熱ゲルツールに、YOYO-1 で蛍光染色した DNA 分子を付着させ安定に操作するためには、PNIPAAm が混合した溶液中で DNA を観察する必要がある。しかし、PNIPAAm が高濃度である場合、PNIPAAm の自家蛍光の影響が生じてノイズとなるため、DNA の蛍光像が観察しにくくなるという問題が生じる。このため、蛍光染色された DNA 分子と PNIPAAm を共存させるためには、PNIPAAm の濃度の調整が必要となってくる。ここで、溶液中に占める

PNIPAAm の濃度と DNA 分子の蛍光強度の関係について、実験的に確認した結果を図 7 に示す。PNIPAAm の溶液中で DNA を安定に観察するためには、図 7 より全体に占める PNIPAAm の割合を 1%以下にする必要があることが分かった。

Fig. 7 Relation between fluorescence intensity and concentration of PNIPAAm

Fig. 8 Hydrogel gelation by focused laser irradiation (PNIPAAm 0.25w%)

Fig. 9 Hydrogel gelation by focused laser irradiation (PNIPAAm 0.5w%)

また、PNIPAAm の濃度とレーザ出力とツール径に

は、相関関係がある。PNIPAAm の濃度を低くした場合、ゲル化しにくくなるため一定のツール径になるまでゲル化させるには、より高いレーザ出力が必要になる。一方、一定の PNIPAAm の濃度でレーザ出力を増加した場合、より大きなツール径が得られる。また、気温による影響も受けやすい。そこで、気温を 25℃で一定の条件で PNIPAAm の濃度とレーザ出力とツール径を実験により確認した。実験は、溶液中に占める PNIPAAm の割合を 0.5%, 0.25%, 0.1%で行い、あるレーザ出力でツール径とそのツール径になるまでに要した時間の関係を求めた。ただし、ツール径の計測は顕微鏡画像から確認できたサイズとした。0.25%での結果は図 8, 0.5%での結果は図 9 に示ようになった。0.1%の場合では、PNIPAAm の濃度が少なすぎたためか、熱ゲルツールを安定に作成することができなかった。図 8, 図 9 より、レーザ出力を上げるにつれツール径が大きくなることが確認できた。またレーザ出力が同じ場合、PNIPAAm の濃度が濃い方がツール径が大きくなることが確認できた。

7. DNA 分子の操作実験

熱ゲルツールによる DNA 分子の間接操作実験を行った。試薬作成の順序として初めに、DNA をティーイーバッファーで薄め、それを YOYO-1 で蛍光染色し、その溶液に PNIPAAm を加え、最後に 2-メルカプトエタノールを加えた。各々の試薬の最終濃度は、PNIPAAm 0.25 w%, YPD Broth 0.125 w%, DNA (T4GT7, NIPPON GENE CO., LTD.) 2.3×10^{-4} mmol/l, YOYO 1 (Molecular Probes) 7.5×10^{-2} mmol/l, 2-メルカプトエタノール (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 3%, ティーイーバッファー (TE buffer PH = 8.0, NIPPON GENE CO., LTD.)であった。レーザ出力は 40 mW で、室温 25.0℃の条件で実験を行った。まず、CCD カメラで熱ゲルツールができていないか確認し、 $\phi 2 \mu\text{m}$ の熱ゲルツールが作成できていたことが確認できた。次に、CCD カメラから SIT カメラに切り替え、DNA 分子を観察する。そして、ステージを固定し、レーザを走査することで DNA を操作した。

Fig. 10 Concept of manipulation of DNA molecules by the gel microtool

Fig. 11 Manipulation of DNA (T4GT7) by the gel microtool

Fig. 12 Concept of DNA tension by the gel microtool

Fig. 13 Tension of DNA (T4GT7) by the gel microtools

図 10 に示すように、DNA 分子をおおうように熱ゲルツールを付着させ操作した結果を図 11 に示した。DNA 分子は熱ゲルツールに付着するとブラウン運動しなくなり、図 11 (a), (b), (c), (d), (e) の順にレーザの軌跡に沿って DNA を安定に操作できていることが確

認できた。

また図 12 に示すように、レーザの焦点位置を制御し、DNA 分子の端付近にゲルを形成し付着させれば、伸張することが可能である。実際に DNA 分子の端付近に熱ゲルツールを付着させ操作した結果を図 13 に示す。この場合も、熱ゲルツールに付着するとブラウン運動しなくなり、図 13 (a), (b), (c), (d) の順にレーザの軌跡に沿って DNA を伸張することができた。そして図 13 (e) でレーザを切ると、元の状態に戻り、再びブラウン運動することが確認できた。

また、レーザ出力を少し上げ 55 mW にすると、 $\phi 5 \mu\text{m}$ の熱ゲルツールが作成することができた。このようにレーザ出力を上昇させることでゲルツールの径を大きくすると、複数の DNA をゲルツール中に取り込みまとめて操作することができた。その結果を図 14 に示した。図 14 (a), (b), (c) の順に時間が経過すると共に、ゲルツールは成長する。そして成長すると共に、DNA を徐々に取り込む。また時間の経過と共に、取り込まれた DNA の量が増えるため、徐々にツールの蛍光強度が高くなっていることがわかる。そして、図 14 (d) でレーザ照射を切った瞬間に、ゲルツールがなくなるため、DNA がゲルツールのトラップから外れ、図 14 (e), (f) の順に放射状に移動していった。この手法を用いることで大量の DNA をマニピュレーションすることができると考えられる。

Fig. 14 Manipulation of multiple DNA (T4GT7)s

ここで各々のツール径による DNA の最大搬送速度を実験により求めた。図 8 の実験条件である PNIPAAm の割合が 0.25%、室温は 25.0°C の条件で行った。レーザ出力を変化させることでツール径を制御

した。実験結果は図 15 に示した。ツール径が $\phi 2 \mu\text{m}$ 以上に大きくなるにつれ、搬送速度が遅くなっているが、これは流体抵抗が大きくなるためと考えられる。一方、 $\phi 2 \mu\text{m}$ よりツール径が小さくなる場合でも、搬送速度が遅くなった。これは、ツールが小さいとトラップ力が小さくなり、レーザの焦点位置を早い速度で動かすとトラップがはずれて、結果的に加熱点が移動することによってゲルがゾルに戻るためであると考えられる。 $\phi 2 \mu\text{m}$ の最大搬送速度は $200 \mu\text{m/s}$ となり、従来の手法と比べ、5 倍程度高速に搬送することができた。

Fig. 15 Relation between transportation velocity and diameter of hydrogel

Fig. 16 Concept of DNA manipulation by two gel microtools

Fig. 17 Manipulation of DNA (T4GT7) by two gel microtools

本論文でのレーザ出力は 40 mW と、従来の 200 nm のビーズを用いた操作手法のレーザ出力と比べると、5 倍程度低いレーザ出力で操作が実現することが可能であった。

また、図 5 のように同期型レーザマイクロマニピュレーションにより 2 つのゲルツールを作成し、図 16 に示すようにそれらを用いて DNA 分子を挟んで操作することで安定に操作する実験を行った。図 17 (a), (b), (c), (d), (e) の順にレーザの軌跡に沿って DNA 分子を安定に操作できることが確認できた。また、レーザ照射を切ると再びブラウン運動が確認できた。またゲルツールで挟んだ場合、DNA がぼやけて見えている。これは、DNA がゲルツール中に入って搬送されているためと考えられる。

8. 結論

本論文ではこれまで直接操作することが困難であった DNA 分子を、温度変化によってゾル・ゲル相転移をおこす熱ゲル化物質を用いて操作する手法を提案し、レーザ出力は 40 mW と低出力で、搬送速度は $200 \mu\text{m/s}$ と高速に搬送できることを実験的に示した。本手法は DNA 分子をひも状で操作でき、化学的修飾も不要である点で従来の操作手法と比べ優れている。また同期型レーザマイクロマニピュレーションを用いることで複数の熱ゲルツールを作成することができ、これを用いることで DNA を安定に操作できることを示した。本手法は、従来までにない新しい DNA の操作手法であり、その有効性が実験的に確認できた。

参考文献

- (1) T. T. Perkins, S. R. Quake, D. E. Smith, S. Chu, (1994), Relaxation of a single DNA Molecule Observed by Optical Microscopy, *Science*, 264, 822-826.
- (2) Y. Harada, O. Ohara, A. Takatsuki, H. Itoh, N. Shimamoto and K. Kinoshita, (2001), Direct observation of DNA rotation during transcription by Escherichia coli RNA polymerase, *Nature*, 409, 113-115.
- (3) H. Oana, K. Kubo, K. Yoshikawa, H. Atomi and T. Imanaka, (2004), On-site manipulation of single whole-genome DNA molecules using optical tweezers, *Appl. Phys. Lett.*, 85, 5090-5092.
- (4) F. Arai, K. Yoshikawa, T. Sakami, and T. Fukuda, (2004), Synchronized laser micromanipulation of multiple targets along each trajectory by single laser, *Appl. Phys. Lett.*, 85, 4301-4303.
- (5) F. Arai, K. Yoshikawa, T. Sakami and T. Fukuda, (2004), Synchronized Manipulation and Force Measurement by Optical Tweezers Using High-speed Laser Scanning, *Proc. of the 2004 IEEE International Conference on Robotics and Automation*, 890-895.

- (6) F. Arai, T. Sakami, K. Yoshikawa, H. Maruyama, T. Fukuda, (2003), Synchronized Laser Micro-manipulation of Microtools for Assembly of Microbeads and Indirect Manipulation of Microbe, *Proc. of the 2003 IEEE/RSJ Int'l Conference on Intelligent Robot and Systems*, 2121-2126.
- (7) S.-C. Huang, M. D. Stump, R. Weiss and K. D. Caldwell, (1996), Binding of Biotinylated DNA to Streptavidin-Coated Polystyrene Latex: Effects of Chain Length and Particle Size, *Analytical Biochemistry*, 237, 115-122.
- (8) Y. Arai, R. Yasuda, K. Akashi, Y. Harada, H. Miyata, K. Kinoshita and H. Itoh, (1999), Tying a molecular knot with optical tweezers, *Nature*, 399, 446-448.
- (9) S. Katsura, A. Yamaguchi, K. Hirano, Y. Matsuzawa, and A. Mizuno, (2000), Manipulation of globular DNA molecules for sizing and separation, *Electrophoresis*, 21, 171-175.
- (10) K. Hirano, Y. Baba, Y. Matsuzawa, A. Mizuno, (2001), Manipulation of single coiled DNA molecules by laser clustering of microparticles, *Appl. Phys. Lett.*, 80, 515-517.
- (11) A. Ashkin, J.M. Dziedzic, (1987), Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria, *Science*, 235, 1517-1520.
- (12) David G. Grier, (2003), A Revolution in optical manipulation, *Nature*, 424, 482-484.
- (13) M. Ishikawa, H. Misawa, N. Kitamura and H. Masuhara, (1993), Poly(N-isopropylacrylamide) Microparticle Formation in Water by Infrared Laser-Induced Photo-Thermal Phase Transition, *Chem. Letters*, The Chemical Society of Japan, 481-484.
- (14) F. Arai, A. Ichikawa, H. Maruyama, T. Uchida and R. Yamauchi, (2005), In-Situ Microfabrication of Permeation Membrane with Photo-crosslinkable Resin for Isolation and Culture of Individual Cells, *Proc. of Int. Conf. on MEMS 2005*, Miami, 822-825.
- (15) H. S. Rye, J. M. Dabora, M. A. Quesada, R. A. Mathies and A. N. Glazer, (1993), Fluoremetric Assay Using Dimeric Dyes for Double and Single Strand DNA and RNA with Picogram Sensitivity, *Analytical Biochemistry*, 208, 144-150.
- (16) A. Kishino and T. Yanagida, (1988), Force measurements by micromanipulation of an actin filament by glass needles, *Nature*, 334, 74-76.