

## 光ピンセット\*

鈴木直哉\*\* 木下一彦\*\*\*

### I. 光ピンセットとは?

光ピンセットは、レーザー光のような強い光を、開口数の大きなレンズ（顕微鏡の対物レンズ等）で強く集光することにより、その焦点付近で物を非接触に捕まえる装置である。ビーズはもちろん、ウイルスから細胞まで、様々な物を捕まえることができる（波長  $1\ \mu\text{m}$  の赤外光レーザーを使えば、水や生体物質に吸収されないので、溶液中の細胞などを生かしたまま捕まえ続けることができる）。光ピンセットは、マイクロマニピュレーションや、分子モータータンパク質の力の測定などに利用されている<sup>1,2)</sup>。

なぜ光で物が捕まえられるのか？光の波長に比べて、捕まえる物の大きさがある程度以上大きい場合には、幾何光学の立場に立って、光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<sup>3)</sup>。図 1A に示すように、焦点の位置より少し外側の位置に球体を置いた場合を考える。光は、球体に入る時と、出る時の 2 回屈折し、その進行方向を変える。つまり、光には運動量が与えられたことになる。この反作用として、同じ大きさで逆向きの運動量が球体には与えられる。そして、これらの合力は光の焦点の方向に向く。この場合のように、屈折のみを考える時には、球体を光の焦点の位置からどちらの方向にずらしても

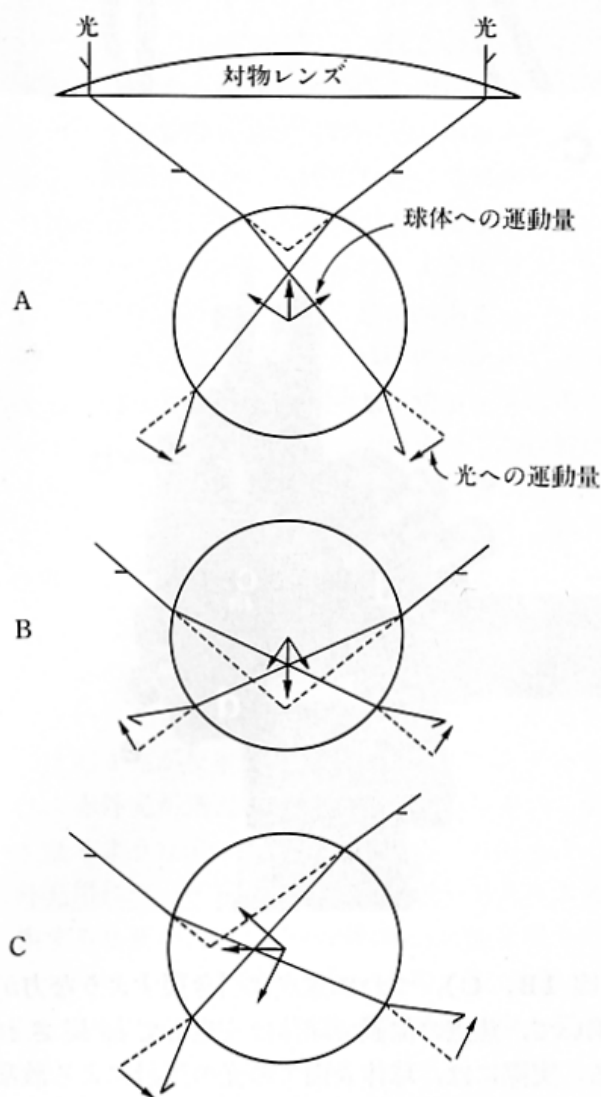


図 1 光ピンセットによる捕捉力

光の屈折の反作用として光ピンセットの捕捉力を説明することができる。球体を光の焦点の位置からどちらの方向にずらしても、常に焦点に引き戻すような力が働いて、焦点の位置で球体は安定して捕捉される。

\* Optical tweezers

\*\* Naoya Suzuki: 名古屋大学理学部物理学教室 (〒464-01 名古屋市千種区不老町)

\*\*\* Kazuhiko Kinoshita, Jr.: 慶應義塾大学理工学部物理学科 (〒223 横浜市港北区日吉 3-14-1)

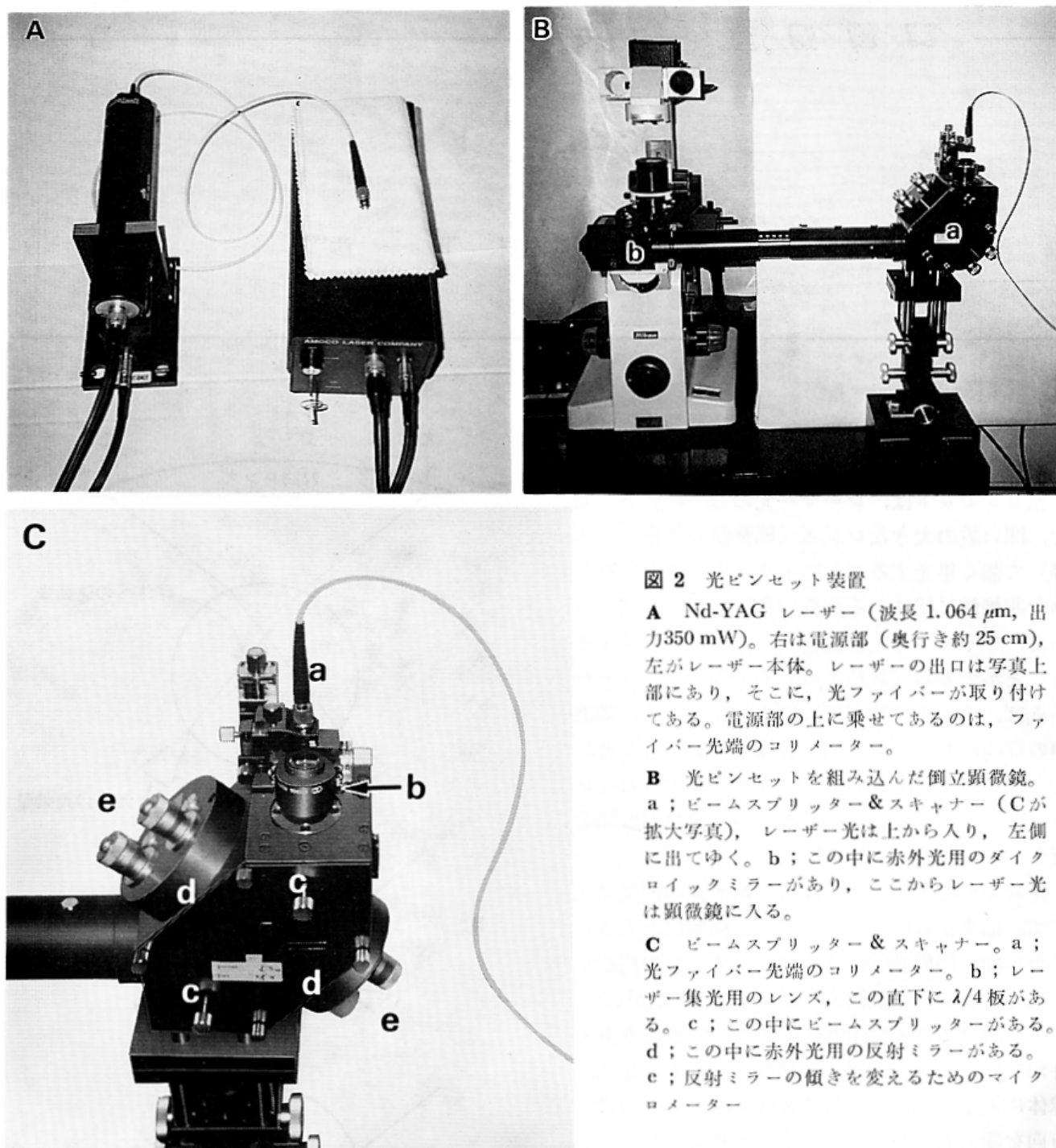


図2 光ピンセット装置

**A** Nd-YAG レーザー (波長  $1.064 \mu\text{m}$ , 出力  $350 \text{ mW}$ )。右は電源部 (奥行き約  $25 \text{ cm}$ )、左がレーザー本体。レーザーの出口は写真上部にあり、そこに、光ファイバーが取り付けられている。電源部の上に乗せてあるのは、ファイバー先端のコリメーター。

**B** 光ピンセットを組み込んだ倒立顕微鏡。a; ビームスプリッター&スキャナー (Cが拡大写真)、レーザー光は上から入り、左側に出てゆく。b; この中に赤外光用のダイクロイックミラーがあり、ここからレーザー光は顕微鏡に入る。

**C** ビームスプリッター&スキャナー。a; 光ファイバー先端のコリメーター。b; レーザー集光用のレンズ、この直下に  $\lambda/4$  板がある。c; この中にビームスプリッターがある。d; この中に赤外光用の反射ミラーがある。e; 反射ミラーの傾きを変えるためのマイクロメーター

(図 1B, C), つねに焦点に引き戻すような力が働いて、焦点の位置で球体は安定して捕捉される。実際には、球体表面での光の反射による散乱力が加わるので、球体の安定捕捉点は焦点の位置より少し外側になる。また、光の波長に比べて、捕まえる物の大きさがある程度以上小さい場合には、光を電磁波と考え、光の電場によって誘起された物の電気双極子と電磁場との相互作用を計算すると、同様の捕捉力が導かれる。ところが、光

の波長と捕まえる物の大きさが同程度である場合には、その捕捉力をきちんと説明する理論がまだない。しかし、実験的には、どの場合でも、光ピンセットはちゃんと物を捕まえることができる。

## II. 光ピンセット装置の構成

### 1. レーザー

試料や水に吸収されない赤外光のレーザーを使うのが最もよい。ただし、赤外光は目に入っても

わからず危険なので、実験中は赤外光用のゴーグルをかけるなどの注意が必要である。必要なレーザー出力は、何を捕まえたいかによって異なる。単に、 $\mu\text{m}$  程度の大きさのポリスチレンビーズを捕まえるだけなら、対物レンズから数 mW の出力が出てくれば十分で、元気よく泳ぐウニの精子を捕まえたいのなら100 mW 程度の出力が必要となる(光ピンセットの捕捉力はレーザーの出力に比例する)。出力を減らすことは、光路の途中に減光フィルターや偏光子を入れることで簡単にできるし、以下に記すように途中の光学系でのロスがかなり大きいので、できる限り大きな出力のレーザーを買った方がよい。ビームの形状は TEM00 (ガウスビーム) をわれわれは使っている。しかし、図1に示したように、対物レンズのふちを通る光の方が捕捉力としてよく効くので(対物レンズの中心付近を通る光はおもに散乱力として働く)、TEM01のような中心より外側に光量の多いビーム形の方が捕捉効率はよくなるとの報告がある<sup>3)</sup>。われわれは、波長1.064  $\mu\text{m}$  で出力350 mW の Nd-YAGレーザー(Amoco 1064-350 P, 図2A)と波長1.047  $\mu\text{m}$  で出力1 W の Nd-YLF レーザー(Amoco 1047-1000 P)を使っている。これらの製品は、本体や電源が小さく空冷式で使い易いが、値段は少々高い。

われわれは、これらのレーザーに光ファイバーを付けて使用している(図2A)。光ファイバーを使うメリットは、後に記すような調節が容易になることで、デメリットは、出力が20%程度落ちることである(出力の低下はファイバー中でのロスではなく、本体のレーザー出口にファイバーをくっつける際に光軸がほんの少しずれることによる)。ファイバーは偏光を保存するタイプのものを使用し、 $\lambda/4$ 板で円偏光にして使うようにすると、偏光による異方性を防ぐことができる(偏光を保存しない光ファイバーを使うと、偏光面がファイバーの形状によって変化してしまう)。

## 2. 顕微鏡

光ピンセットは通常は光学顕微鏡に組み込んで使用する。組み込むための顕微鏡は、外からレーザー光を入れられて、それを対物レンズから出せるような光学系が確保できれば基本的には何でも

よい。われわれは倒立の落射蛍光顕微鏡(Nikon TMD)を使っている(図2B)。蛍光顕微鏡に組み込む場合で、蛍光像が必要な時には、水銀灯用の穴からレーザー光を入れ、赤外光用のダイクロイックミラーを使えばよいので簡単である<sup>4)</sup>。透過光像も蛍光像も必要な場合には、蛍光用のダイクロイックミラーの他に赤外光用のダイクロイックミラーを入れ込んで、そこにレーザー光を当てるようにしなければならない(Nikon TMDの場合にはそのようなスペースはない)。また、蛍光像のみ必要な場合には、コンデンサーレンズの代わりに光ピンセット用の対物レンズを取り付けてしまう方法がある<sup>5)</sup>。これらの方法以外に、一般的に使えるのは、光の出力ポートであるカメラポートや接眼レンズ用のポートからレーザー光を入れ、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である(ただし、光学系によっては、赤外光が逆経路をたどれるようにするために、プリズムなどを変える必要があることもある)。われわれは、Nikon TMDのペンタプリズムを取り替えた。われわれは、接眼レンズ用のポートを改造して、接眼レンズのすぐ下の位置に、赤外光用のダイクロイックミラーを置いて、そこにレーザー光を当てるような光学系を作った(図2B)。普通の顕微鏡内で使われているレンズやプリズムは、可視光用の無反射コーティングがされているので、赤外光に対しては反射によるロスが大きい(たとえば空気と無コートガラスの境界面では約4%が反射される)。このロスを減らすには、赤外光が透過するレンズの数なるべく少なくなるような光学系を採用するか、もしくは、赤外光用にコーティングしたレンズやプリズムと交換する必要がある。われわれは、可能な限りのレンズ、プリズムを赤外光用のものに取り替えた(ただし、接眼レンズでの可視光像は少し悪くなる)。

## 3. 対物レンズ

対物レンズはなるべく開口数の大きいものがよい。われわれがおもに使っているのは Nikon  $\times 100$  N.A.=1.30油浸レンズである。しかし、油浸やドライレンズの場合には、カバーガラスのすぐ上(正立の顕微鏡ではカバーガラスの直下)での

み光はきちんと焦点を結び、そこから離れるほど大きな収差が生ずるため、カバーガラスから離れた位置で物を捕まえるとその捕捉力は弱くなる(Nikon  $\times 100$  N.A. = 1.30 油浸レンズの場合には、カバーガラスから  $20 \mu\text{m}$  離れると捕捉力はかなり弱くなり、 $40 \mu\text{m}$  も離れると焦点が合わなくなって捕まらなくなる)。これは、カバーガラスの厚み調節用の補正環付きの対物レンズでは、補正環を適当に調節することでかなり改善される。最もよいのは、そのような収差の生じない水浸レンズを使うことで(たとえば Zeiss  $\times 63$  N.A. = 1.20)、水浸レンズではカバーガラスからどれだけ離れようとも(作業距離内なら)ほぼ同じ捕捉力で物を捕まえることができる。また、対物レンズでは、50%程度の赤外光のロスがある。

#### 4. その他の光学系

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での大きさが、ちょうど対物レンズの瞳の大きさ(対物レンズのおしりの穴の大きさ、 $\times 100$ のレンズでは約  $5 \text{ mm}$ )程度になるように広げてやる必要がある。これが小さすぎると光ピンセットの捕捉効率が悪くなり、大きすぎると光のロスが大きくなる。また、単に捕まえるだけでなくマニピュレーションするのなら、レーザースポットの位置(物の捕捉点)が自由に動かせるようにする必要がある。様々な方法があるが、われわれが用いたのは、対物レンズの瞳の像のできる位置にミラーを置いて、そのミラーの傾きを変えることによりレーザースポットの位置を動かすという方法である(図2C)。われわれはビームスプリッターでレーザー光を2つに分け、それぞれに上記のミラーシステムを通すことで、2つのレーザースポットを独立に動かすことのできるシステムとした(図2C)。また、レーザー光を分けた時点で、それぞれに別の減光フィルターを入れることで、2つの異なる捕捉力のレーザースポットを作ったり、片方だけに長焦点のレンズを入れることで、Z方向にもレーザースポットを動かすことができるようになってきている。光学系の設計に関しては、それぞれの目的に合ったものを自分で考えるか、または、業者などに頼むかする。

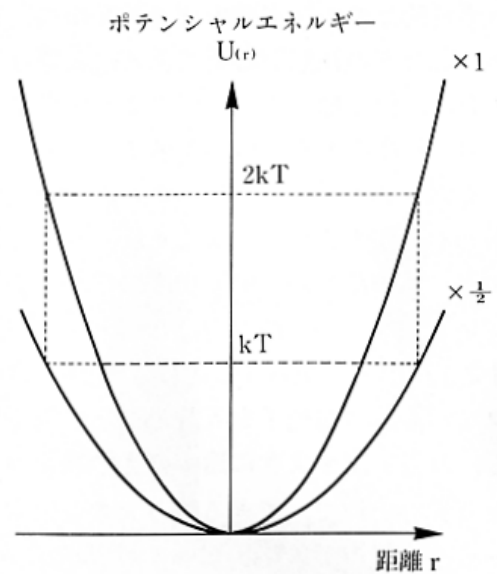


図3 捕捉力のポテンシャルを求める

レーザー出力を半分に減らすと、ポテンシャルはその高さが半分になり、 $kT$ でのブラウン運動の範囲は拡がる。そして、その広がり元は元のポテンシャルの  $2kT$  の広がりを表す。

### III. 光ピンセット装置の調節

赤外光は目では見えないので、レーザー光を使って光軸を合わせてゆくのは困難である。レーザー光の波長の半分の波長である緑の光も、赤外光用のダイクロイックミラーで反射されるように作ってもらい、緑の光を使うようにするとよい。透過光用のタングステンランプからの光を、緑のフィルターに通して対物レンズに入れる。この光を基にして途中の光学系を調節していき、最終的にレーザー光の出口に届くようにする。対物レンズの瞳の像の位置を知りたい場合には、位相差用の対物レンズを使って、位相差リングの像がはっきり見える位置を探すようにする。レーザーの位置と傾きの微調節は、実際にレーザー光を入れてビーズをトラップしながら行う。われわれは、この調節が容易にできるように、ファイバー先端のコリメーターを、傾きも変えられる3次元ステージにつけている(図2C)。最初は、レーザーのスポットがどこにあるのか判らないので、ビーズ濃度が濃くて、厚みのあるサンプルを使う。広視野の接眼レンズで見て、ビーズがブラウン運動と異なる変な動きをしている所が、レーザーのスポット位置である。レーザーの位置を調節して、これを

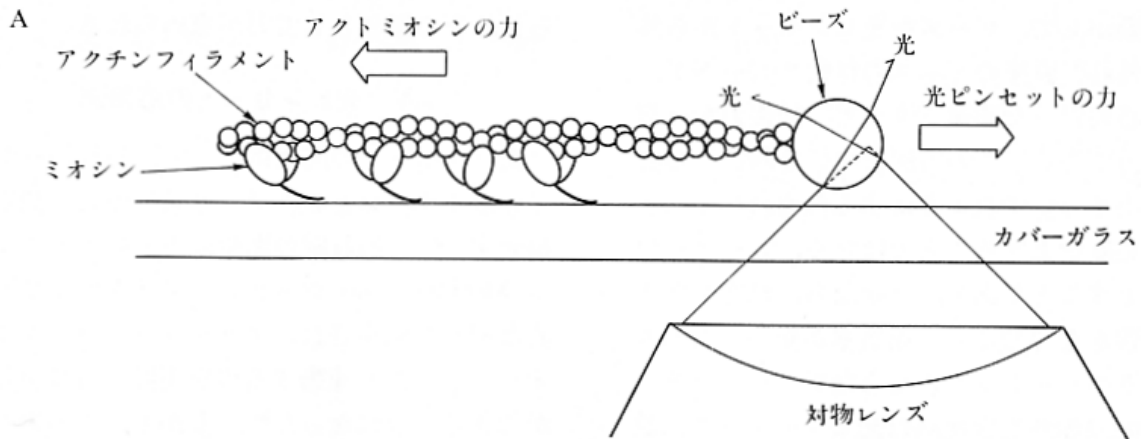


図4 光ピンセットでミオシンと綱引きをする

**A** 原理図。カバーガラスの表面をミオシン（限定消化で可溶化したもの）でコートし、その上に蛍光ラベルしたアクチンフィラメントとエネルギー源である ATP の入った溶液をのせて、蛍光顕微鏡下でアクチンフィラメントにミオシン上を滑り運動させる<sup>9)</sup>。光ピンセットで、アクチンフィラメントの後端に結合しているビーズを捕まえ、アクチンフィラメントを綱の代わりにして、ミオシンと光ピンセットとの間で綱引きをする。

**B** 実際に、滑り運動中のビーズ付きアクチンを光ピンセットで捕まえているところの蛍光顕微鏡像。矢印が指し示す位置にレーザー光のスポットがあり、そこでアクチンフィラメント後端のビーズを捕まえている。ミオシンはアクチンフィラメントを通じて、ビーズを引っ張ろうとするので、アクチンフィラメントはピンと伸びた状態になる（他の滑り運動しているフィラメントはぐにゃぐにゃしている）。ビーズは直径  $1 \mu\text{m}$ 、アクチンフィラメントの実際の太さはおおよそ  $7 \text{nm}$ 、スケールは写真の縦の長さが約  $40 \mu\text{m}$ 。



視野のまん中に移動させる。ビーズが特定の方向に流れるのではなく、あたかも噴水のように、わき上がってきて、まわりに一様に拡がってゆくように、レーザーの傾きを合わせる。ビーズの薄いサンプルに取り替え、ビーズ1個をトラップして、その像のピントが合うように、レーザー光の焦点を合わせれば調節終了である。

#### IV. 捕捉力のキャリブレーション

光ピンセットの捕捉力はどれくらいなのか？光ピンセットの捕捉力を知る方法としてよく使われるのは、流体力学的な力と比較する方法である。ストークスの式としてよく知られているように、流体中の静止球体には  $6\pi\eta av$  ( $\eta$ : 粘度,  $a$ : 球体

の半径,  $v$ : 流速) の抵抗力が働く。水中で半径の判っているポリスチレンビーズを使えば、 $\eta$  と  $a$  は決まるので、流速 ( $v$ ) がパラメーターとなる。フローセル中のビーズを光ピンセットでトラップし、実際に水を流す方法もあるが、もっと手軽にできるのは、ステージを動かして、スライドガラスやカバーガラスと一緒に中の水を動かす方法である。つまり、どれくらいの速さでステージを（つまり、ビーズのまわりの水を）動かした時に、ビーズが光ピンセットのトラップから外れるのかを測って、捕捉力を決める。この時、ステージを動かす速さを、何らかのメカニカルなシステムでコントロールする方法もあるが、よく使われるのは、手で適当に遅くしたり速くしたりしながらス

テージを動かして、ビーズを光ピンセットから外し、その外れた直後のビーズの移動スピードが、外すのに必要だった流速と考えると、捕捉力を計算するやり方である。この方法を用いる際に、必要な流速が小さくてすむようにするためになすべきことは、粘度を上げるのではなく、レーザーの出力を落とすことである。なぜなら、粘度を変えるために何かを混ぜると、屈折率が変わってしまい、キャリブレーションにならないからである。波長  $1 \mu\text{m}$  の赤外光を使った光ピンセットで、数  $\mu\text{m}$  程度の大きさのビーズを捕まえた時の最大捕捉力は理論的<sup>3)</sup>にも実験的<sup>6)</sup>にも  $1 \text{ pN/mW}$  程度である。

上記の方法では、捕捉力の最大値は得られるが、たとえば、安定捕捉点からビーズが  $10 \text{ nm}$  ずれた時にどれだけの力がかかっているのか、というような力の分布を知ることはできない。われわれは、捕捉されたビーズのブラウン運動の解析から光ピンセットの捕捉力の分布を求める方法を開発した。光ピンセットの力はポテンシャルエネルギーとして表せると考えて、このポテンシャルの形を決めてやる。始めに定性的に説明する(図3)。ポテンシャル中にあるビーズのブラウン運動の範囲は、ポテンシャルの  $kT$  (常温での熱エネルギー) のエネルギーレベルの広がりを見せている。レーザーの出力を半分に減らすと、ポテンシャルはその高さが半分になり、 $kT$  でのブラウン運動の範囲は広がる。そして、この広がり元元のポテンシャルの  $2kT$  (常温での熱エネルギーの2倍) のエネルギーレベルの広がりを出す。レーザー出力を  $1/4$  にすれば  $4kT$ 、 $1/8$  にすれば、 $8kT$  の広がりが解るというわけで、ポテンシャルの形が得られる。実際には、レーザー出力を  $1/N$  にした状態でブラウン運動しているビーズの位置を、画像解析装置を使って33ミリ秒毎に  $\text{nm}$  の分解能で決定し<sup>7)</sup>、そのデータから、安定捕捉点からの距離( $r$ )におけるビーズの存在確率分布  $P(r)$  を導く。この存在確率分布  $P(r)$  はポテンシャル  $U(r)$  とは次の式で表す関係がある。

$$P(r) \propto \exp(-U(r)/N \cdot kT)$$

従って、確率分布  $P(r)$  の対数をとって、 $-N \cdot kT$  倍することでポテンシャル  $U(r)$  の形が決め

られ、その傾きとして力が求められる。

## V. 光ピンセットの応用例

光ピンセットの応用例として、われわれが行っているミオシンとアクチンの系での力の測定例を紹介する<sup>8)</sup>。筋収縮の顕微鏡下でのモデル系である Motility assay システム(図4A および図の説明参照)が開発され、アクチンフィラメントがミオシン上を滑り運動するのを実際に目で見るができるようになった<sup>9)</sup>。しかし、この系だけでは、滑りの速さの測定はできても、力の測定はできない。そこで、われわれは光ピンセットを使ってこのアクトミオシン系の力を測定することにした。アクチンフィラメント自体は細すぎて光ピンセットで直接捕まえることはできないので、アクチンフィラメントにビーズを付け、そのビーズを捕まえることにした。アクチンフィラメントには方向性があり、滑り運動をする際の前端と後端とはあらかじめ決まっている。そこで、アクチンフィラメントの後端に結合する性質のあるゲルゾリンというタンパク質を、直径  $1 \mu\text{m}$  のポリスチレンビーズに共有結合させることで、アクチンフィラメント後端に選択的にビーズを結合させた。滑り運動中のアクチンフィラメント後端に結合しているビーズを光ピンセットで捕まえることにより、アクチンフィラメントを綱の代わりにして、ミオシンと綱引きをすることができた(図4)。光ピンセットの光出力を適当に調節し、トラップ力とミオシンの出す力と同程度にすると、ビーズが不規則に振動するのが観察され、この像を、画像解析装置で処理して、ビーズの位置の変化を  $\text{nm}$  精度で追跡することができた<sup>7)</sup>。そして、このビーズのトレースから、われわれの使っている Motility assay システムでは、アクトミオシンは、アクチンフィラメント  $1 \mu\text{m}$  当り約  $1 \text{ pN}$  の力を出し、その力はかなり大きく揺らいでいることが判った。

## 文 献

- 1) Special Section on "Optical Trapping", Mayall, B.H. (ed.), *Cytometry*, **12**: 479-510, 1991.
- 2) Ashkin, A., Schutze, K., Dziedzic, J.M., et al.: *Nature*, **348**: 346-352, 1990.

- 3) Ashkin, A. : *Biophys. J.*, **61** : 569-582, 1992.  
 4) Seeger, S., Monajembashi, S., Hutter, K.-J., et al. : *Cytometry*, **12** : 497-504, 1991.  
 5) Visscher, K., & Brakenhoff, G.J. : *Cytometry*, **12** : 486-491, 1991.  
 6) 斎藤 究, 柳田敏雄 : 生物物理, **31** : 278-281, 1991.  
 7) Gelles, J., Schnapp, B.J., & Sheetz, M.P. : *Nature*, **331** : 450-453, 1989.  
 8) 鈴木直哉 : パリティ, **7(10)** : 37-38, 1992.  
 9) Kron, S.J., Toyoshima, Y.Y., Uyeda, T.Q.P., et al. : *Methods Enzymol.*, **196** : 399-416, 1991.

書

評

「細胞の秘密」—生命の実体と起源を探る

C ド デューヴ 著  
 三代俊治・長野敬 訳

千里ライフサイエンス振興財団理事長  
 岡田善雄

著名な生理学者で、1974年度のノーベル医学・生理学賞の受賞者である de Duve が、生命の基本単位としての細胞の成立に焦点をあてて、生命の起源を論じた労作である。

地球上の生命の原初の時代として推察されている「RNAの世界」の前段階に原始代謝反応触媒の世界として「チオエステルの世界」を持ち込んでいるところに説得力がある。そして最初のオリゴヌクレオチドの出現には、せいぜい数万年のオーダーを要するに過ぎないと推論する。これは地質化学的に考えられる数億年のオーダーに比べれば、はるかに短い時間単位であり、従って、生命の発生には、一般に想像されているような、一定の限りなく安定な環境条件の持続は必ずしも必要ではない、と主張している。

この設定を出発点として、生物学的情報伝達の進化の考察に進み、生命の封じ込め、カプセル化、原細胞の成立を論じ、さらに、とてつもなく長い道程を経て出現する原核生物、次いで真核生物の成立までを推論して終わっている。一旦、真核生物が登場してしまえば、その後の今日までの進化は、自己触媒的ともいえるほどにスピードアップしたという

ことらしい。

私は基礎医学者の一員で、生命の起源論にもともと余り関心を持っていない。それよりも、疾患を中心に、その予防、診断、治療への工夫の試行錯誤の中に研究の焦点をもって来た。人間の現状と近い将来にばかり目を向けて来たことになる。生物現象をレトログレードに思考することも勿論して来たが、生命の起源論のためにではなく、疾患の理解を深めるため、あるいは医療への工夫に結び付かないかと藁をもつかむ気持ちで見えて来たわけである。私の若い頃を思い出してみると、オパーリンの生命の起源が盛んに論じられていたが、この分野を毛嫌いしていた。その正否を実証することが本質的に不能な分野だからである。

そんなわけで、この分野の著作をほとんど読んだことのない私が書評するのだから、他の著作との優劣を論じる力はない。この著作そのものの読後感のみになることを許してもらわねばならない。

日本語訳も中々に見事で、一気に読み下すことができた。論旨もしっかりしており、私の知らないこと、意識していなかったこと、など次から次ぎに現われ、なるほどと原始の

世界を垣間見ているような思いがあった。生命の起源からの道程を、ここまで論破した著者のエネルギーに敬服した。この種の起源論として、多分相当高い価値のある著作なのであろう。

それと同時に、この労作にもう1つの見方があるように思えた。20世紀に大きく展開した分子生物学、細胞生物学の集積がこの中にあるのである。多岐に亘ってきた生物学の知識をまとめあげる1つのうまい方法に、生命の起源と進化を軸に語りあげる道がある、とこの著作を読み終って、つくづく感じたことであった。このような流れで学生に講義をしてみたら面白そうである。

それにしても、生き物としての人間の将来を、生命の起源や進化論の時間スケールで語ろうとすると、人口問題、地球環境問題を含めてベニミステックなものに必ずなってしまう。時間軸は、我々の思考を如何様にもあやつれる魔物である。生物科学は過去を振り向くのは得意であるが、未来表現にはむいていないらしい。

そんなことを、この著作から感じた。それにしても、この機会を与えて下さったことは誠に有難かった。生命の起源論という分野は知的作業としては奥の深い分野で、正確で莫大な知識と推論へのはてしない迫力を要求するものだ、ということがわかったからである。

A5判 323頁 図45  
 ¥3,914 (税込) 円300  
 1992年 医学書院