

先端融合科学特論

1回、2回

先端バイオ計測基礎

情報科学研究科 杉浦忠男

複数の異なる研究分野にまたがる学際的な研究領域について講義を行う。

先端融合科学特論I (10/7, 14, 21, 28)

「生命を測る技術」と題して、先端バイオ関連計測に焦点を当て、その基礎原理から実現方法、適用分野までの講義を行う。

杉浦(情報)、駒井(バイオ)、徳田(物質)、佐甲靖志(理化学研究所)

先端融合科学特論II (11/4, 11, 18, 25)

バイオインスパイアードサイエンス・シンセティックバイオロジー・システムバイオロジーに関して講義を行う。

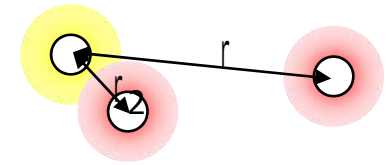
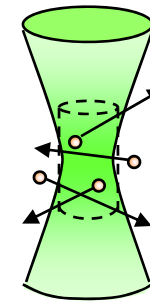
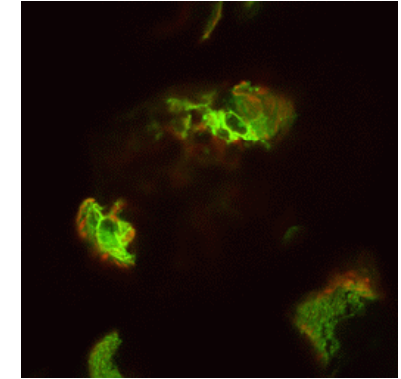
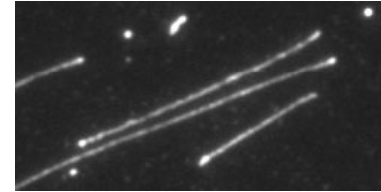
作村(情報)、別所(バイオ)、駒井(バイオ)、菊池(物質)、伊藤隆司(東京大学)

2008/10/7

先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

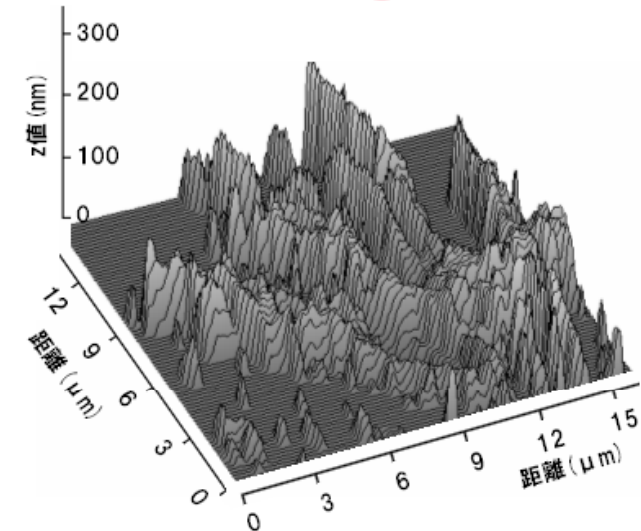
1) 先端バイオ計測 - 基礎-

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング
 - バイオイメージングの基礎
 - 光学顕微鏡、蛍光
 - 共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)
 - 光ピンセットの基礎



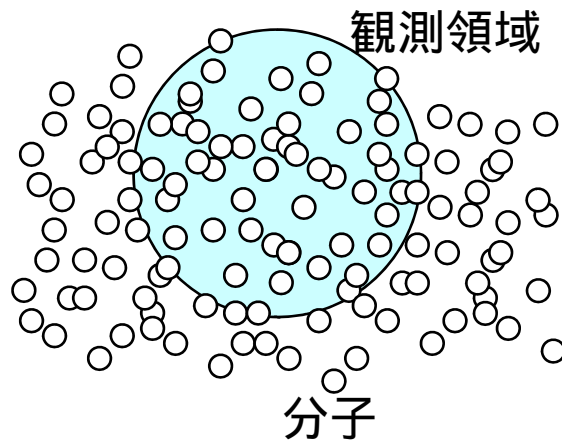
2) 先端バイオ計測 - 応用-

- ・ 一分子計測
 - 一分子計測の基礎
 - 一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測
 - 蛍光共鳴エネルギー移動
 - 蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



マクロな系と一分子系

マクロな系

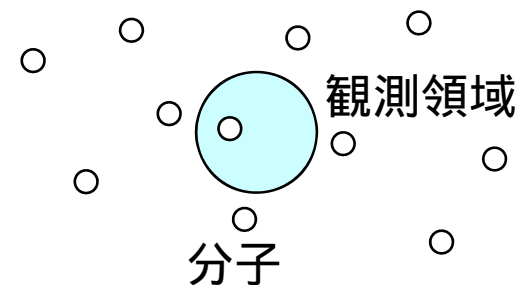


計測対象の分子の分散具合に
比べて観測領域が大きい

→ 一度の計測に関与する
分子数が多くなる

- ・多くの分子の平均的性質が計測される
- ・マクロで定義される物理量(温度、Gibbs自由エネルギー)などが計測可能

一分子系



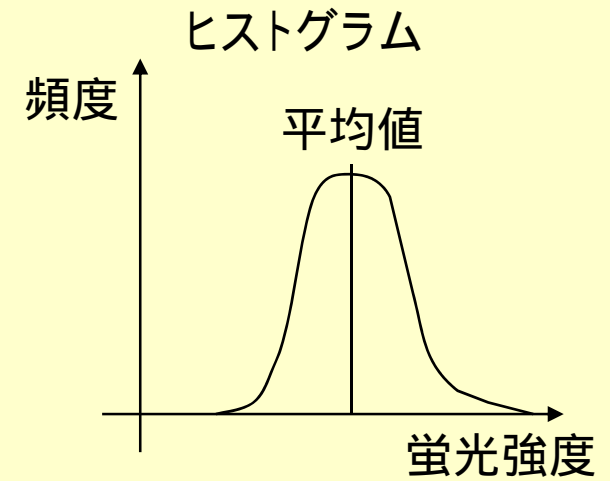
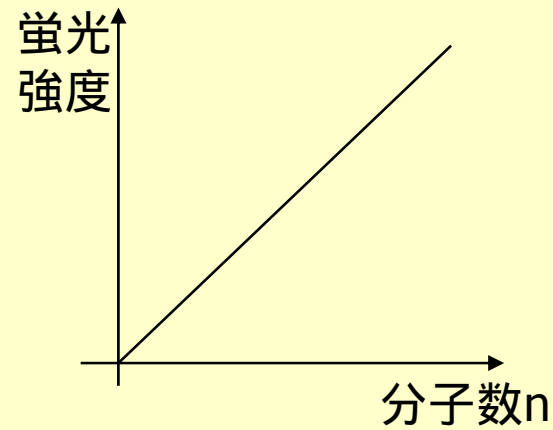
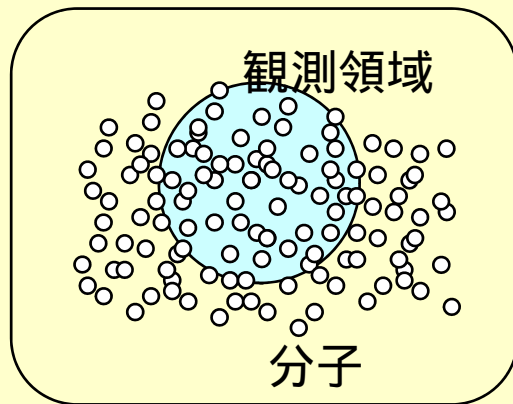
計測対象の分子の分散具合に
比べて観測領域が小さい

→ 一度に計測に関与する
分子が高々数個程度

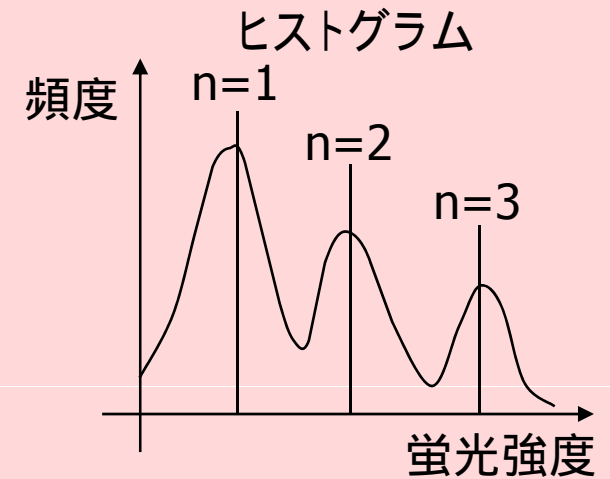
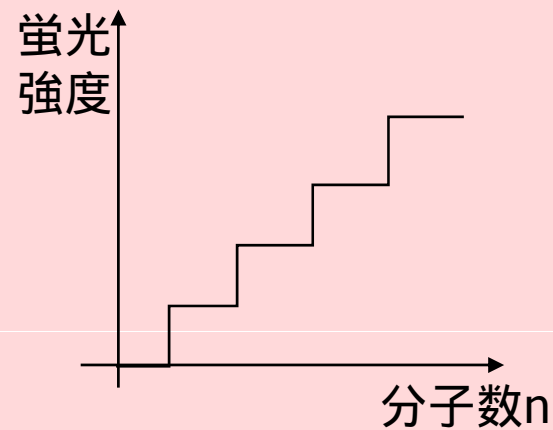
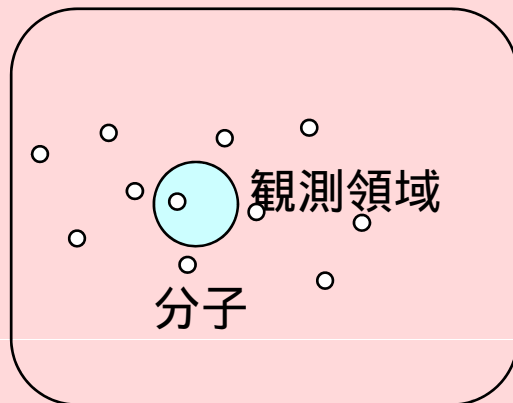
- ・個々の分子の性質を計測できる
- ・分子の運動や力学的性質(力)などが計測可能

一分子蛍光の性質

マクロな系では、

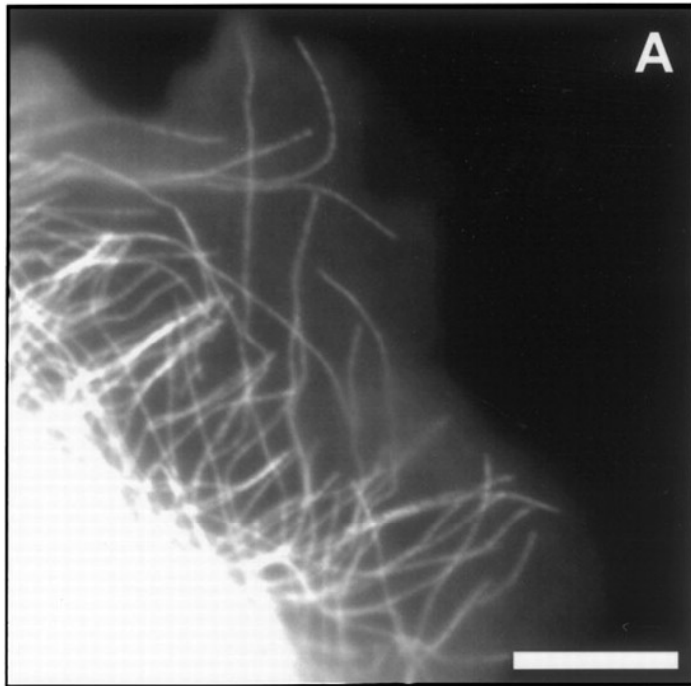


一分子系では、

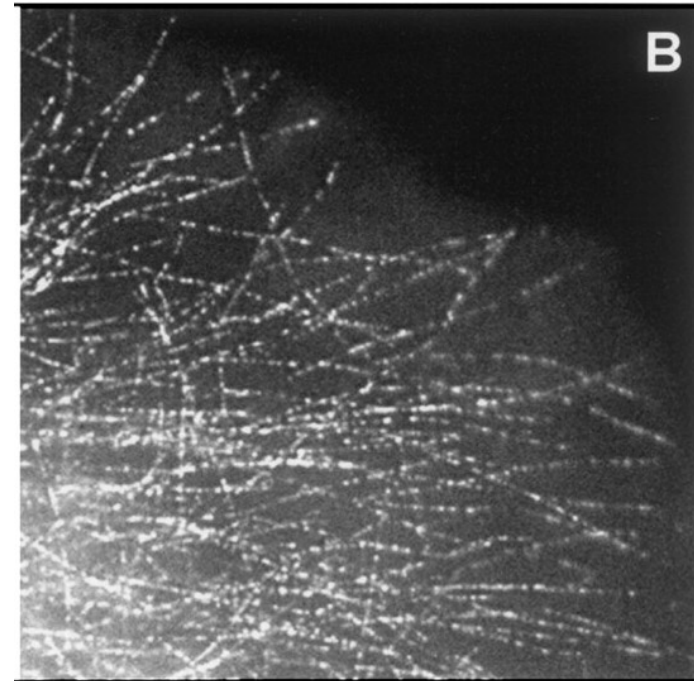


Fluorescent Speckle Microscopy (FSM)

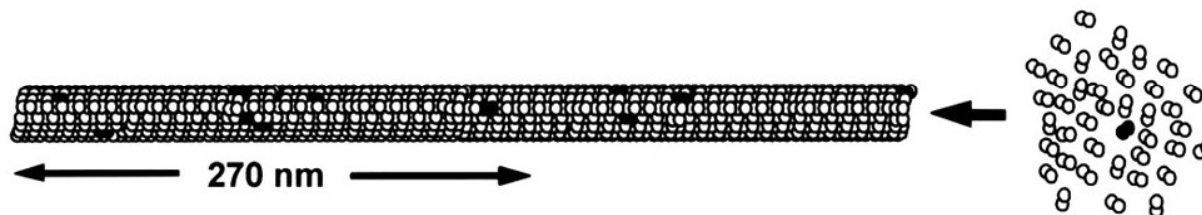
Microtubelin に蛍光色素を導入して観察



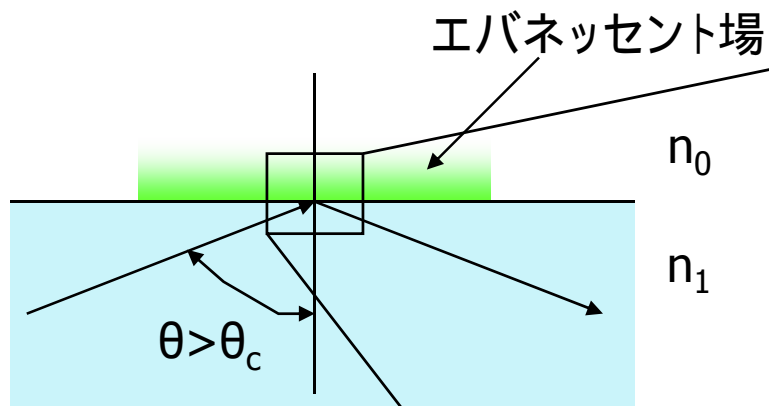
導入割合を50%にした場合



導入割合を1.25%にした場合



全反射とエバネッセント場



θ : 入射角、 θ_c : 臨界角
 φ : 屈折角

$$\text{全反射条件} \\ \theta > \theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_0}{n_1}\right)$$

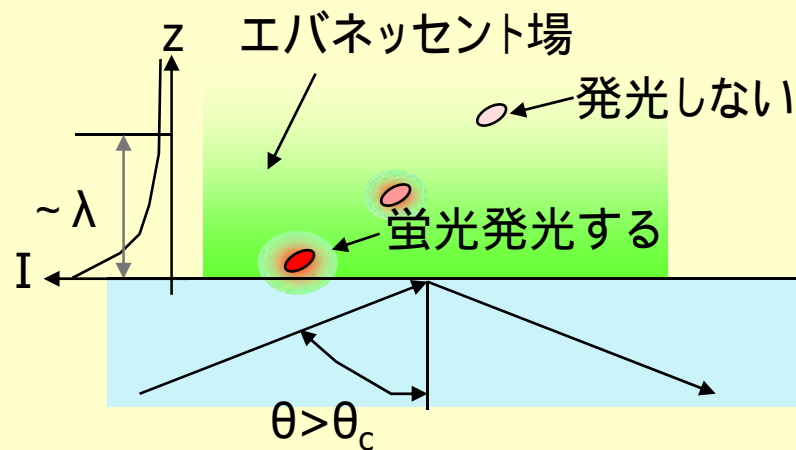
エバネッセント場

エバネッセント場 全反射条件で光が入射したときに低屈折率媒質側に生じる光の場

- ・ 波長程度の距離で指数関数的に減衰する
- ・ 蛍光分子を励起できる
 - > 表面近傍の分子のみを励起
- ・ 粒子で散乱される
 - > 散乱光強度が距離に依存

エバネッセント照明

1) 蛍光を励起する



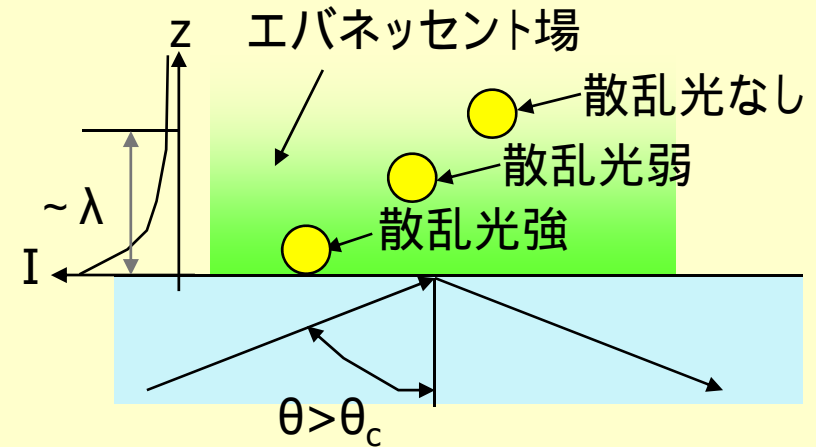
エバネッセント場中に蛍光分子があると
蛍光励起できる

波長程度の距離で指数関数的に減衰する

- > 表面近傍の分子は励起効率高い
- > 基板から離れていると励起されない

➡ 基板表面の分子を選択的に観察

2) 粒子で散乱される



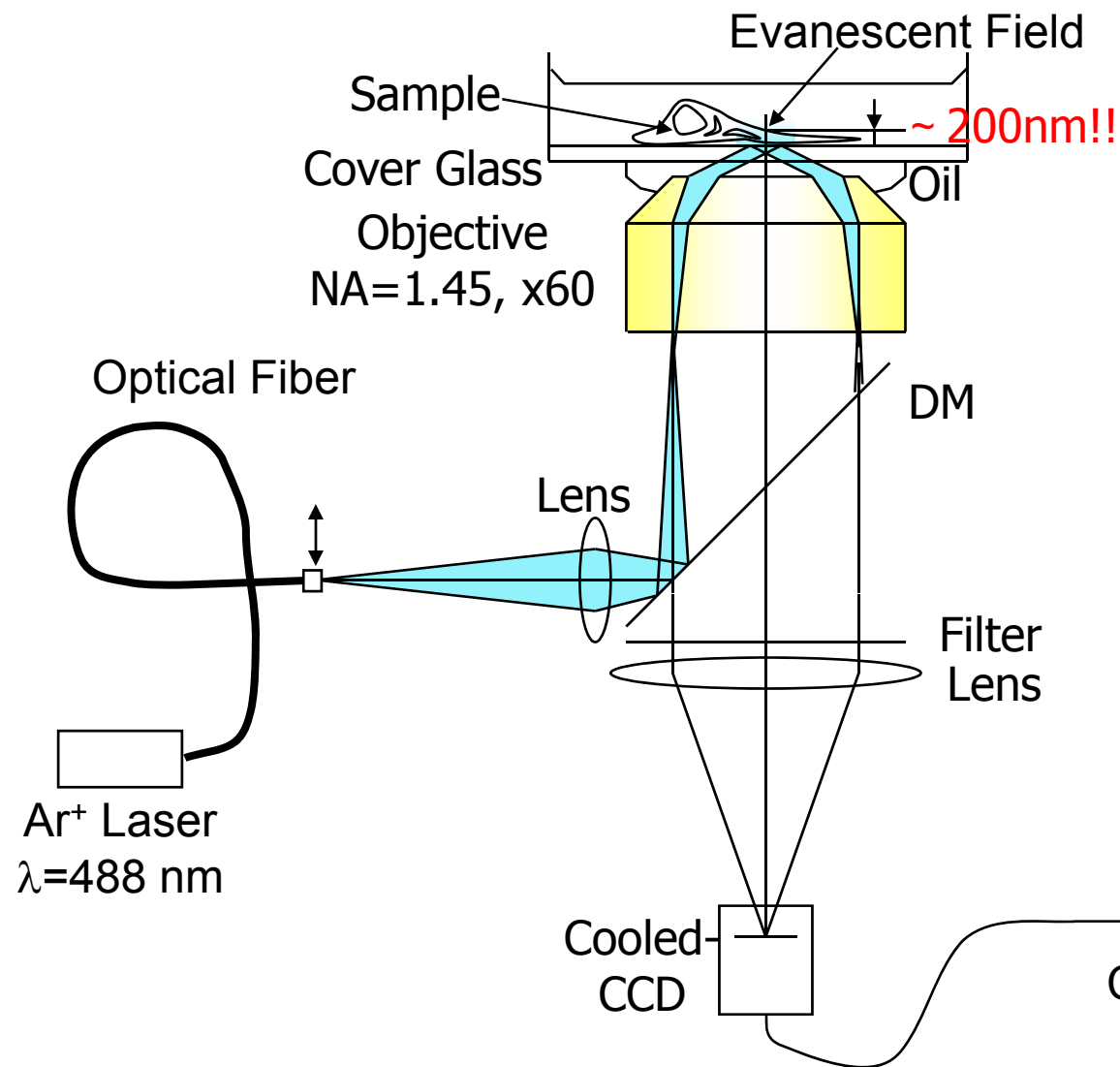
エバネッセント場中に粒子があると
光散乱が起こる

波長程度の距離で指数関数的に減衰する

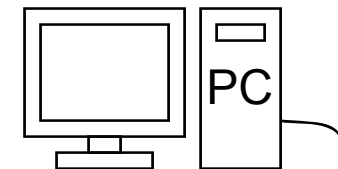
- > 表面の粒子は散乱光強
- > 基板から離れていると散乱光なし

➡ 粒子と基板の距離を高分解能で計測

エバネッセント顕微鏡 光学系

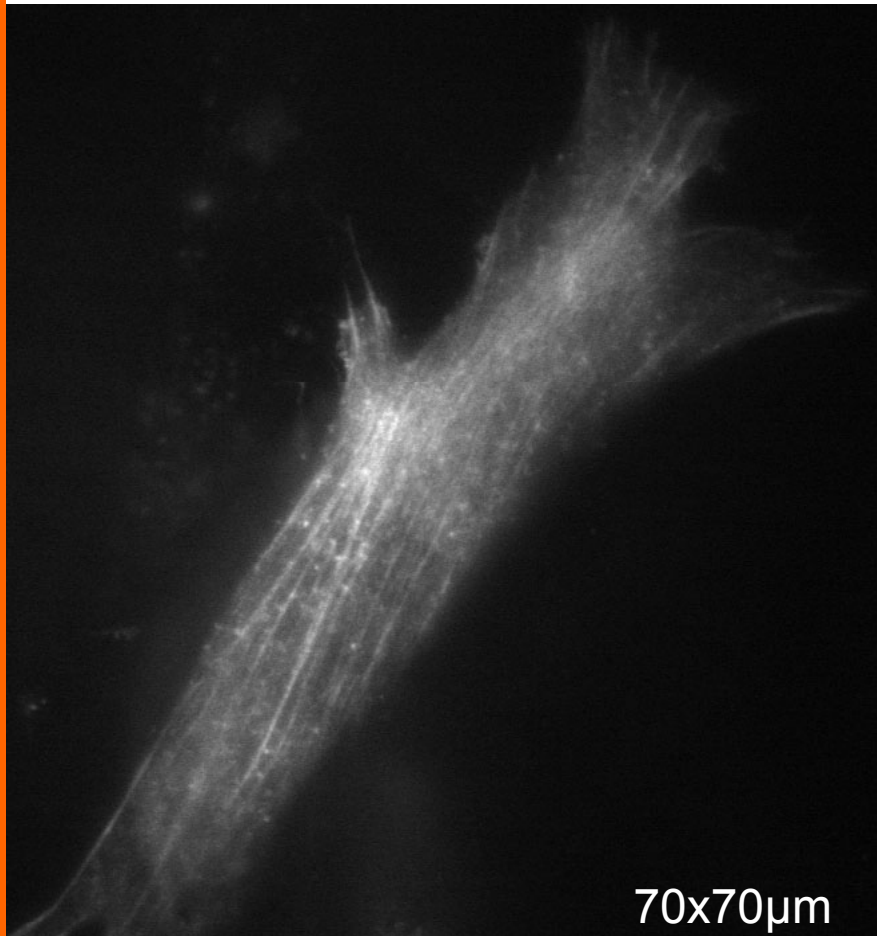


エバネッセント顕微鏡
NAIST (VBL, 1F)

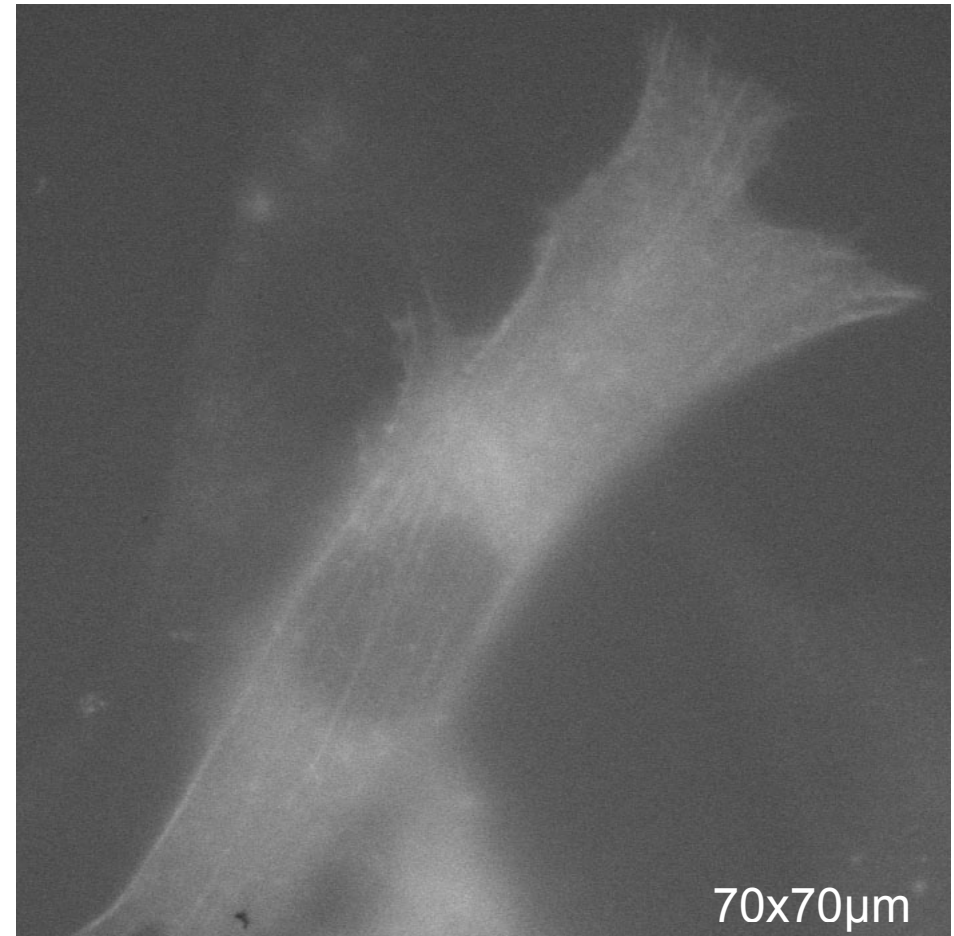


エバネッセント顕微鏡と落射蛍光顕微鏡

マウス繊維芽細胞 Balb/3T3 GFP-actin



エバネッセント顕微鏡像

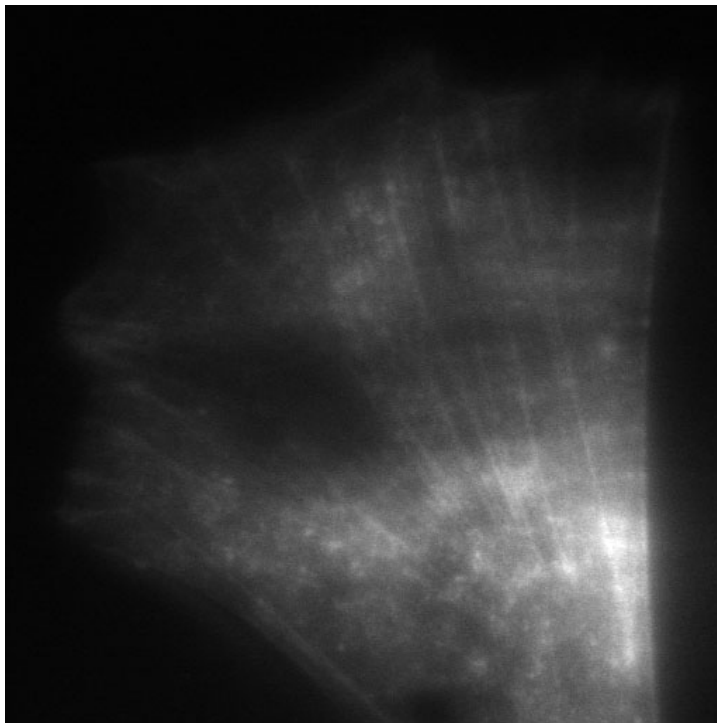


落射蛍光顕微鏡像

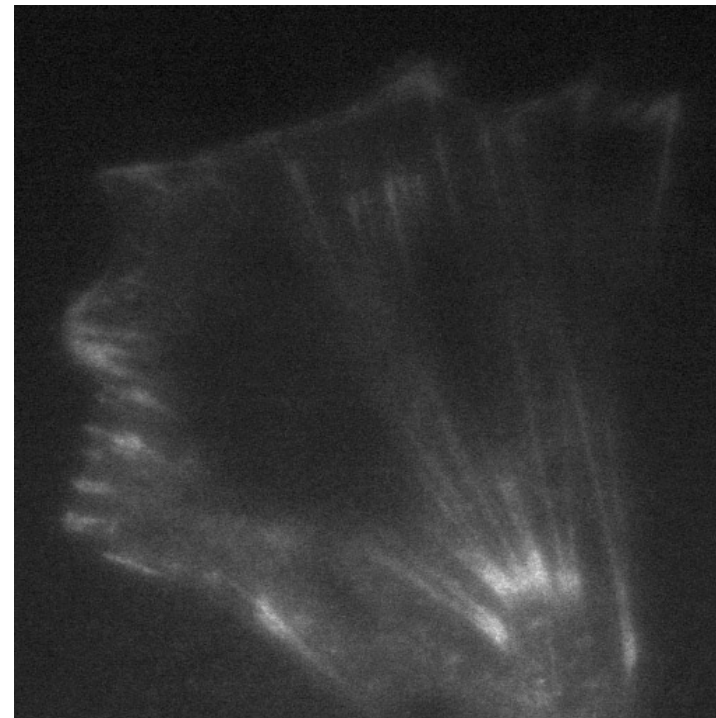
エバネッセント顕微鏡による細胞の観察例

マウス繊維芽細胞 Balb/3T3

GFP-actin



侵入長: 168 nm

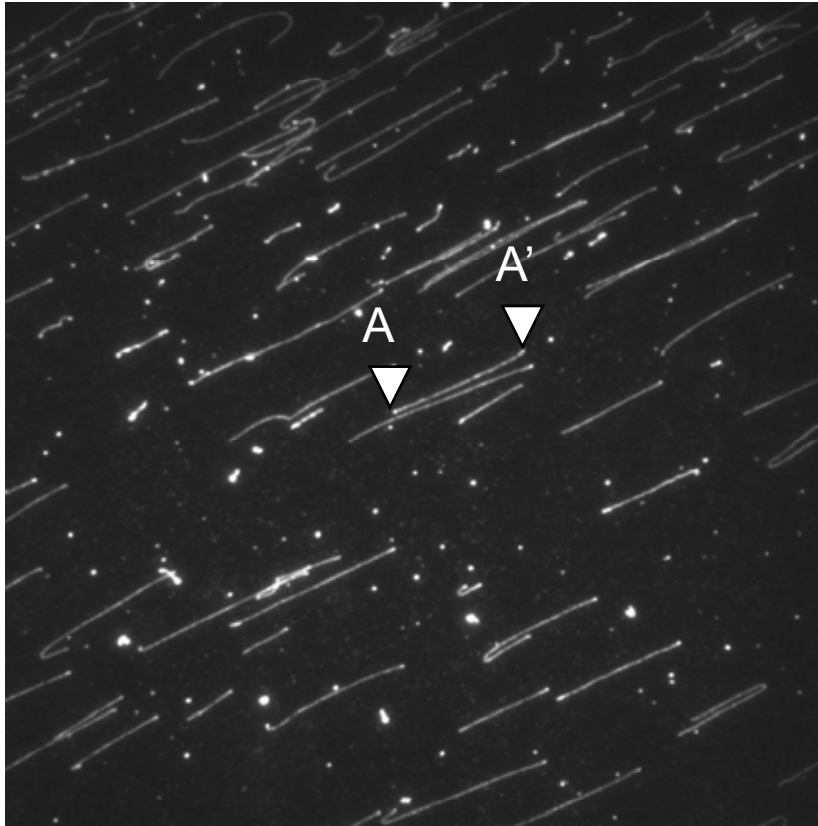


侵入長: 129 nm

50x50μm

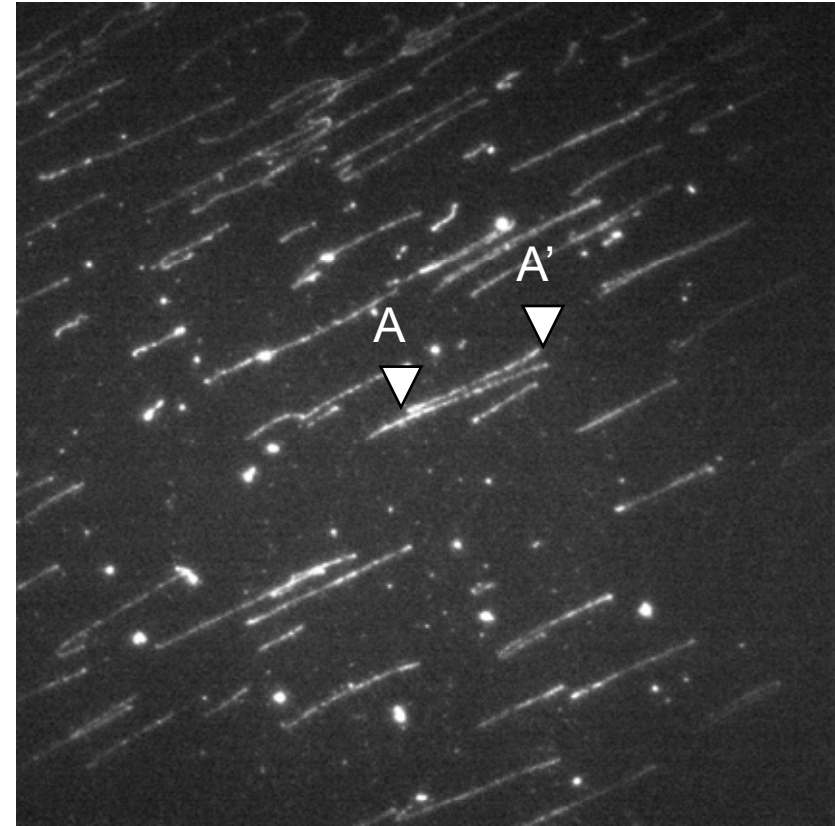
一分子DNA上のGCコンテンツ分布の計測

λ DNA: 48,502bp



(a)

YOYO-1で染色
(ほぼ一様に染色される)

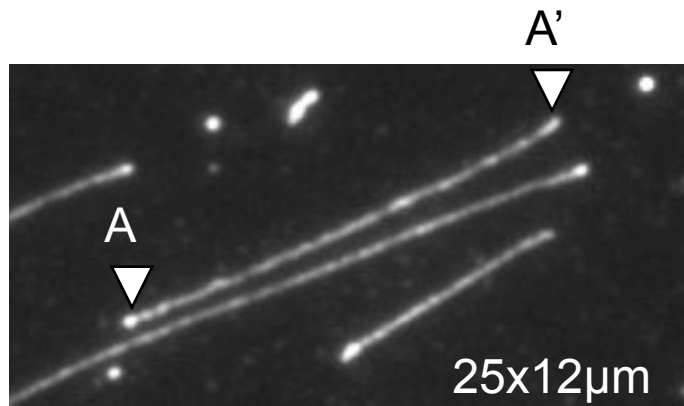


(b) 100x100 μ m

7-AADで染色
(GC特異的に染色される)

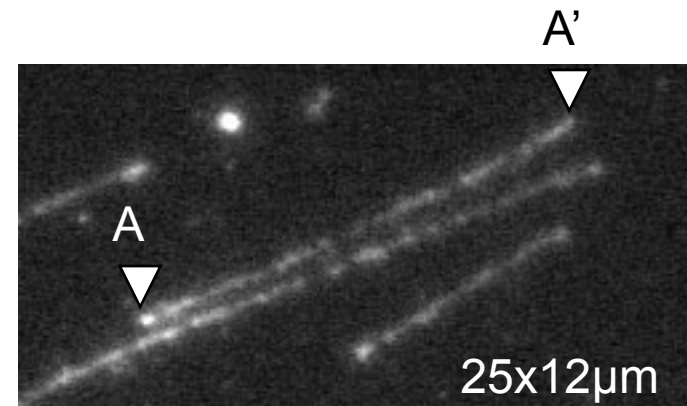
一分子DNA上のGCコンテンツ分布の計測

λ DNA: 48,502bp



(a)

YOYO1で染色
(ほぼ一様に染色される)



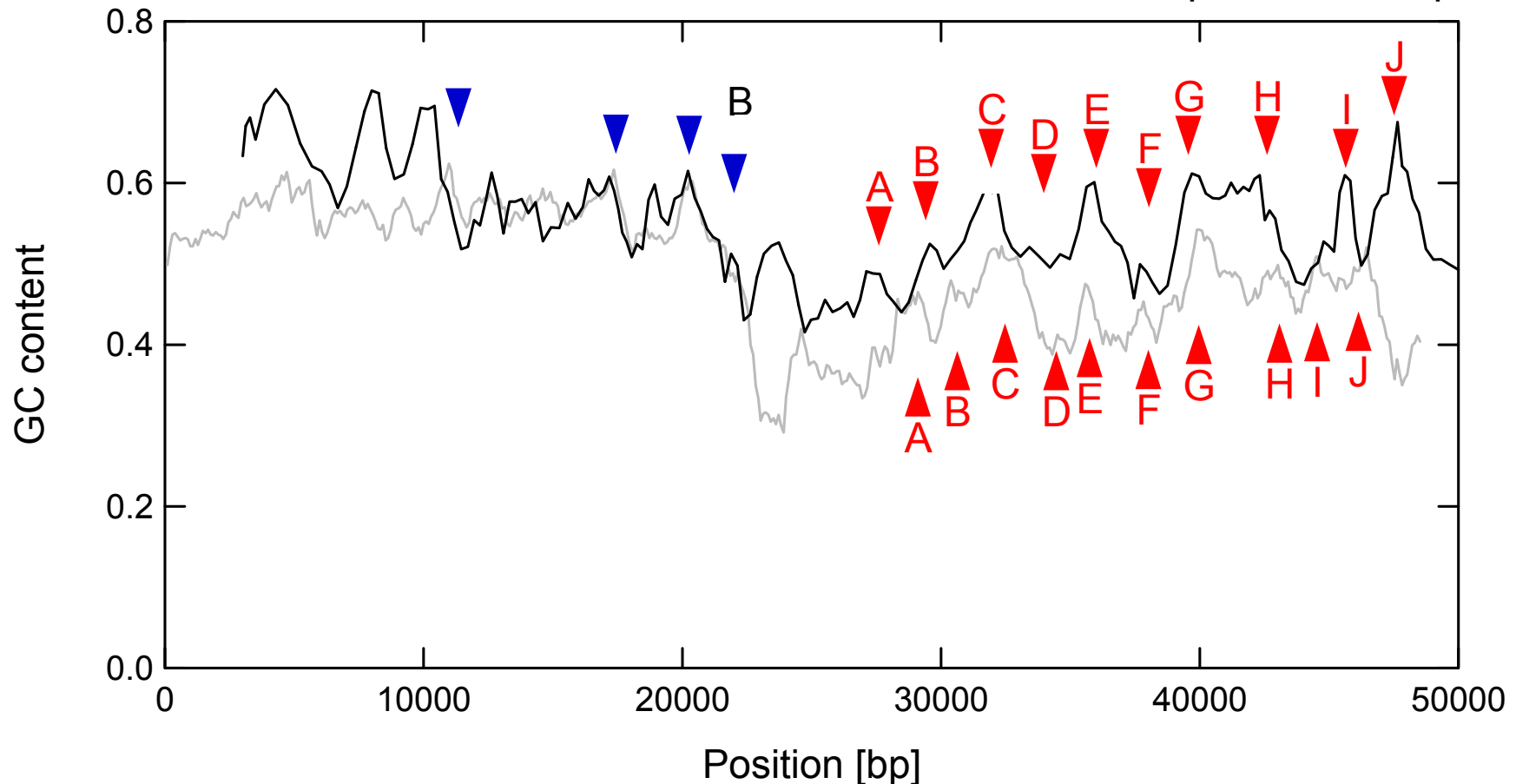
(b)

7-AADで染色
(GC特異的に染色される)

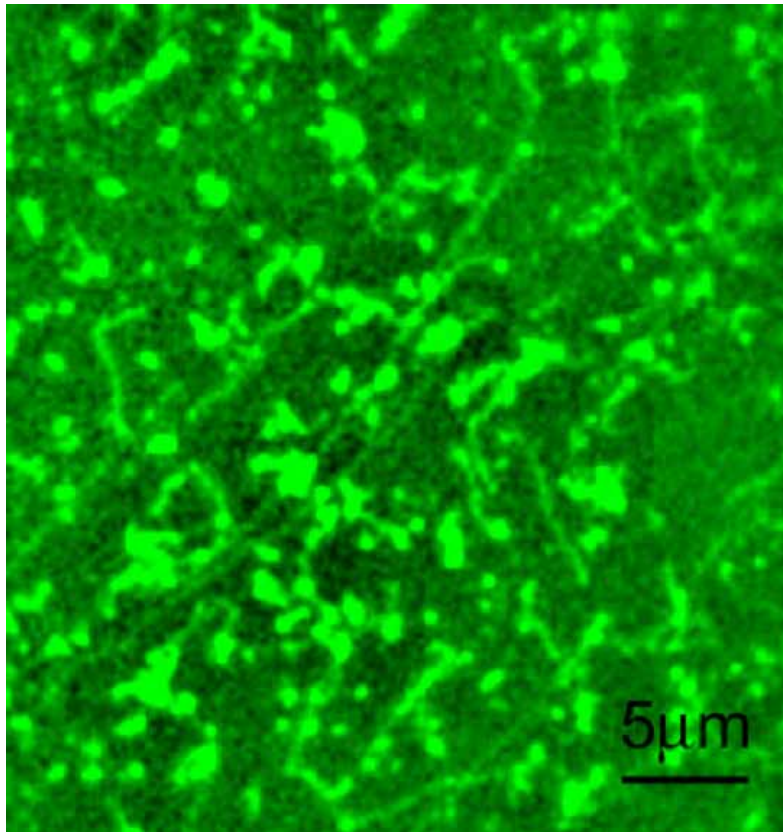
単位長さあたりに含まれるDNA塩基数を補正

塩基配列データベースからGCコンテンツ分布を予測 - > 測定結果と比較

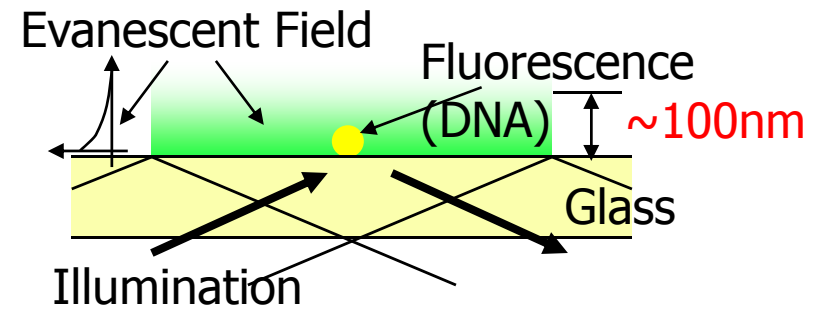
鎖長: 48,502 bp, 窓長: 600bp



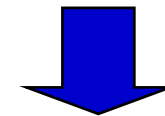
エバネッセント顕微鏡による一分子DNAの観察



λ DNA stained with YOYO1

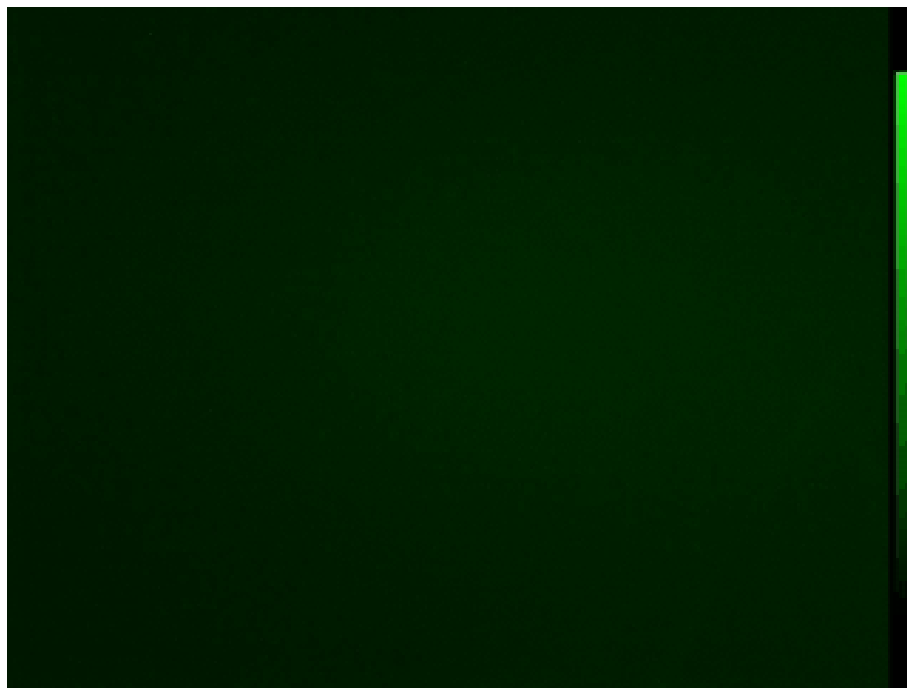


- Low Background



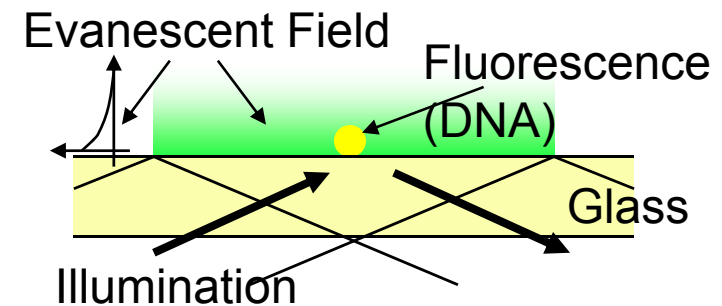
Single Molecule Detection

DNA吸着過程の観察



Substrate: APS-coat Glass

Evanescent Illumination

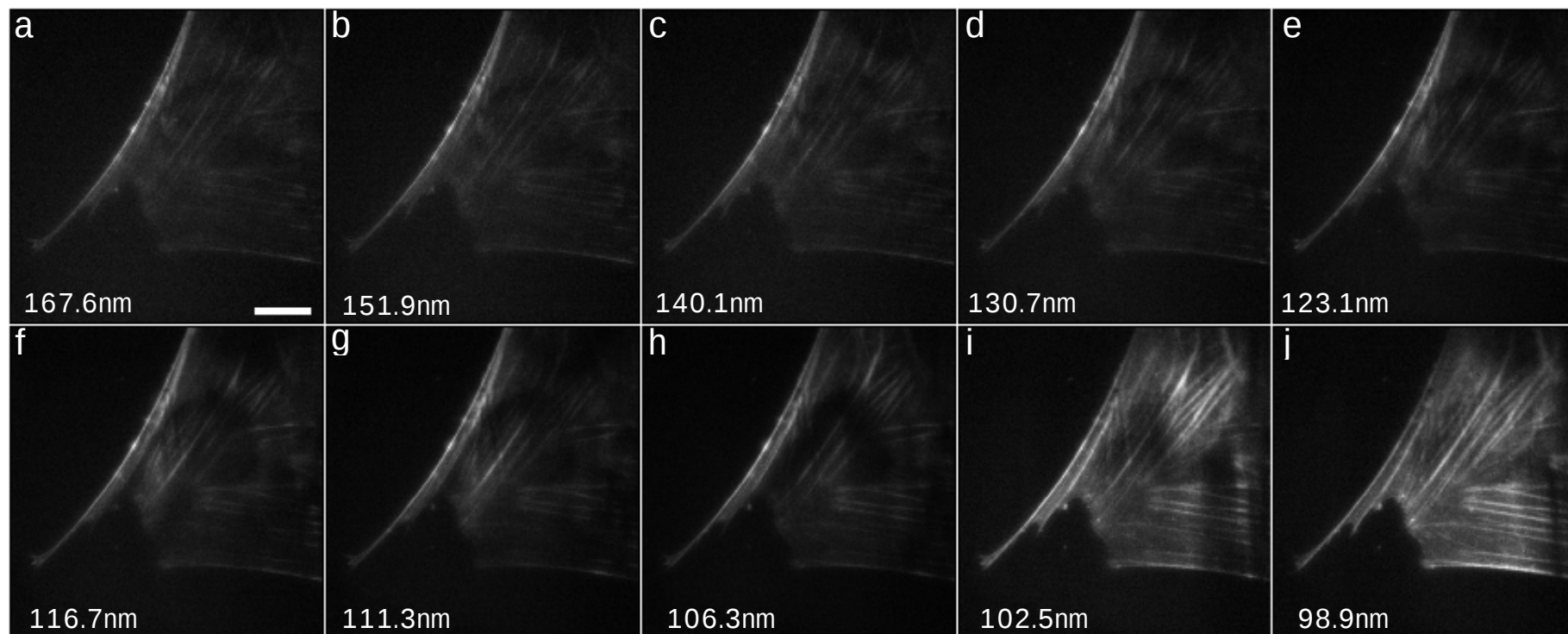


吸着したDNAのみが
蛍光発光する。

⇒ 吸着量モニター

細胞内アクチンフィラメントの計測

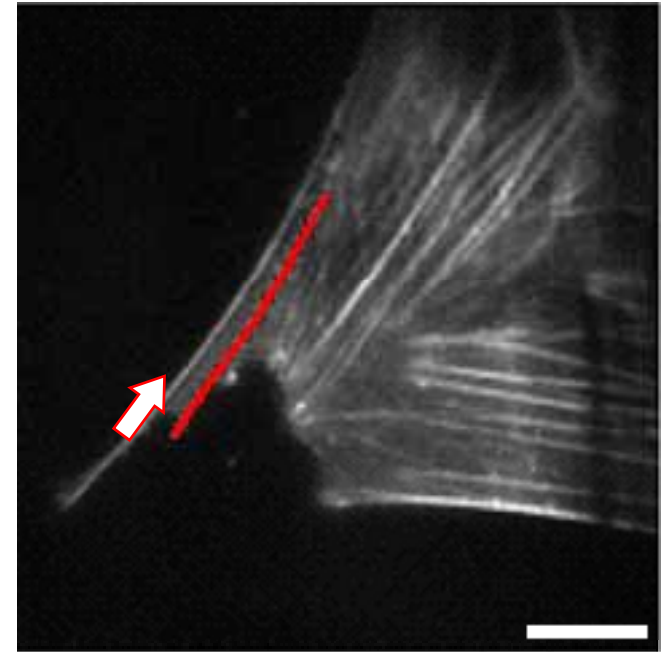
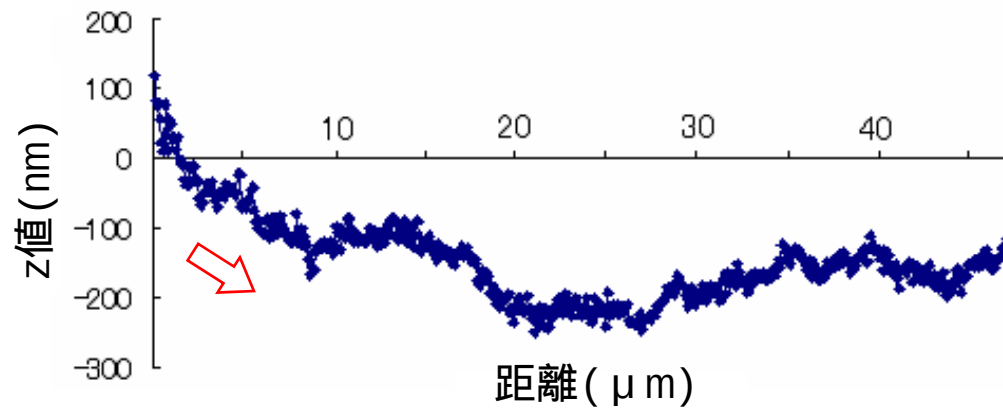
(BAR=20 μm)



侵入長を変化させながら取得した10枚の細胞画像(1024 × 1024画素)

細胞内アクチンフィラメントの計測

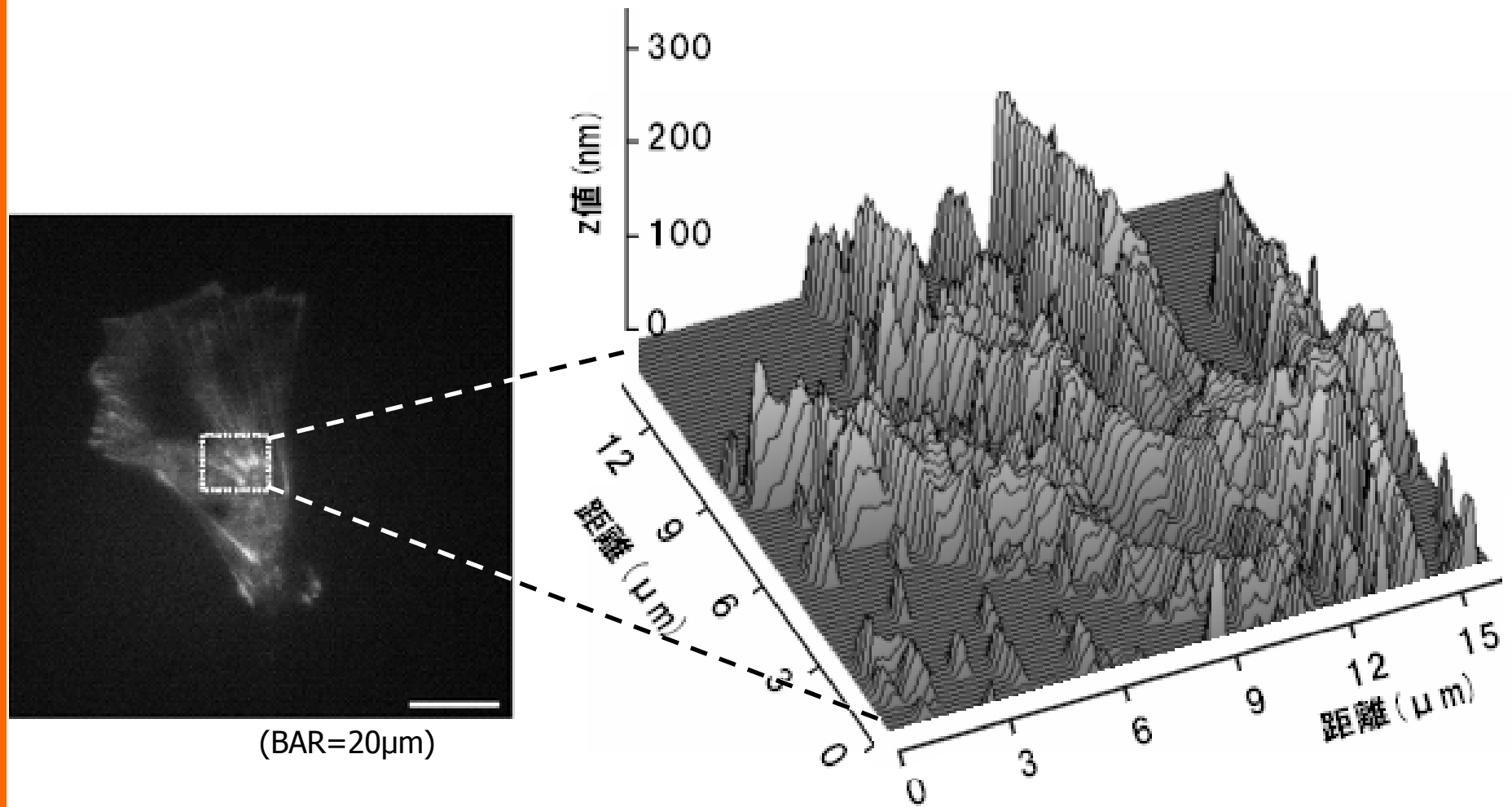
- ・実際に、細胞内に存在するアクチンフィラメントについて計測を行なった。



(BAR=20 μm)

- ・計測には30% sucrose solutionの補正值(1.38)を使用した。

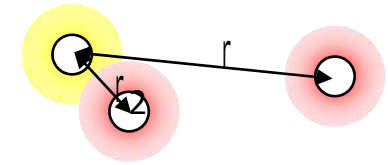
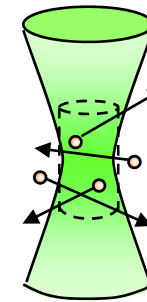
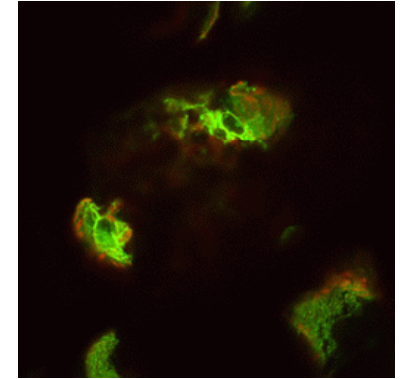
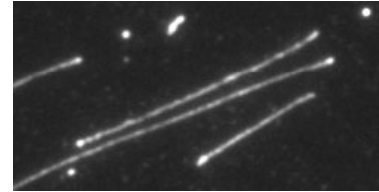
エバネッセント顕微鏡による分子の3次元分布計測



先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

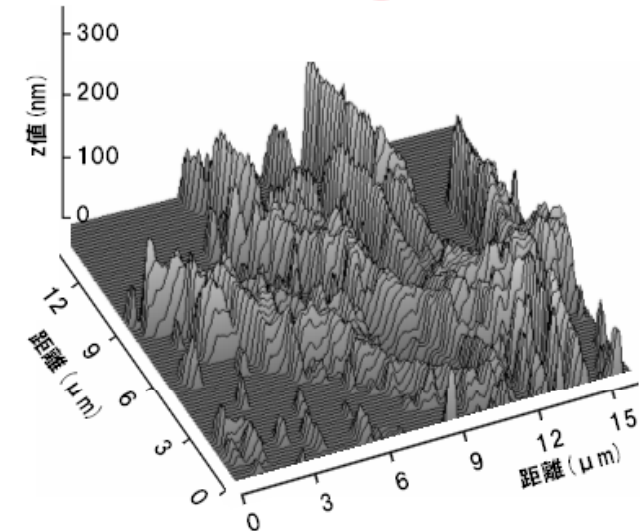
1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング
 - バイオイメージングの基礎
 - 光学顕微鏡、蛍光
 - 共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)
 - 光ピンセットの基礎



2) 先端バイオ計測 - 応用 -

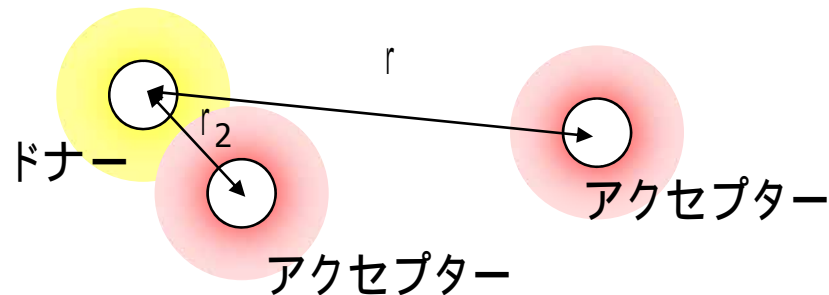
- ・ 一分子計測
 - 一分子計測の基礎
 - 一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測
 - 蛍光共鳴エネルギー移動
 - 蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



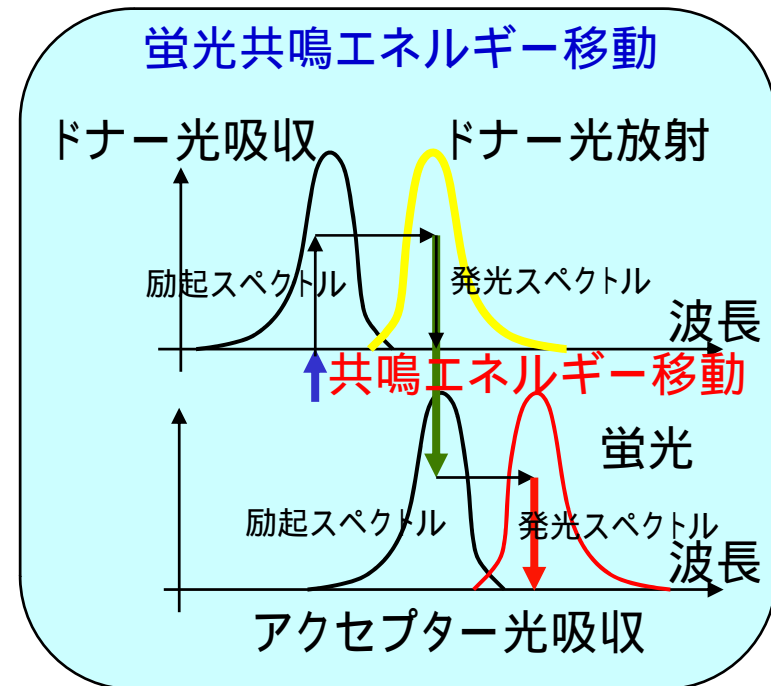
FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

蛍光共鳴エネルギー移動

- ドナー分子 アクセプター分子
 - エネルギー移動の確率が距離 r の6乗に反比例
 - > 10nm以下の距離まで近づいたときに起こる
 - > 分子間距離を計測できる
- 分子間相互作用計測に用いられる



- よく用いられる系
 - Cy3-Cy5
 - CFP-YFP

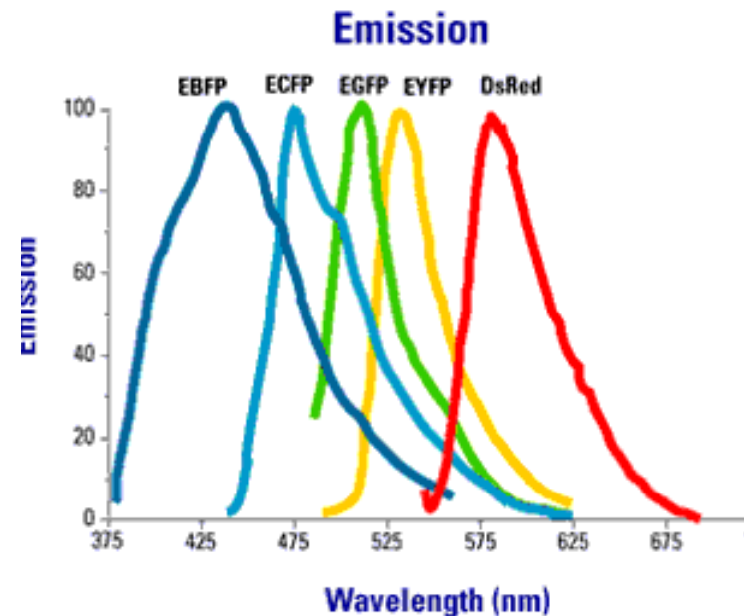
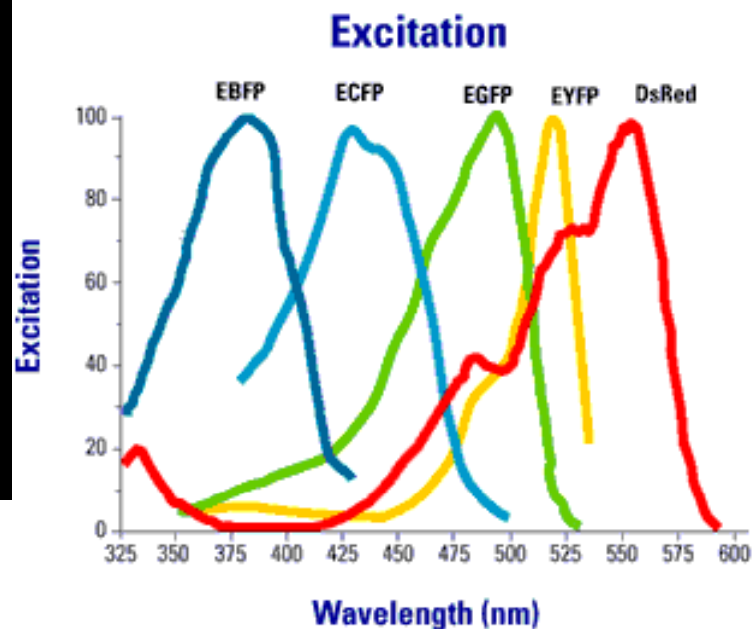
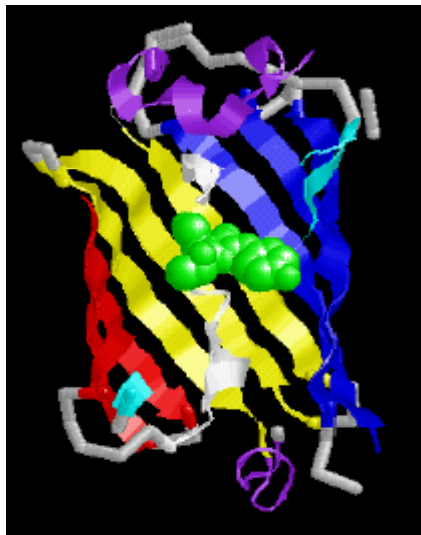


GFP (Green Fluorescent Protein)

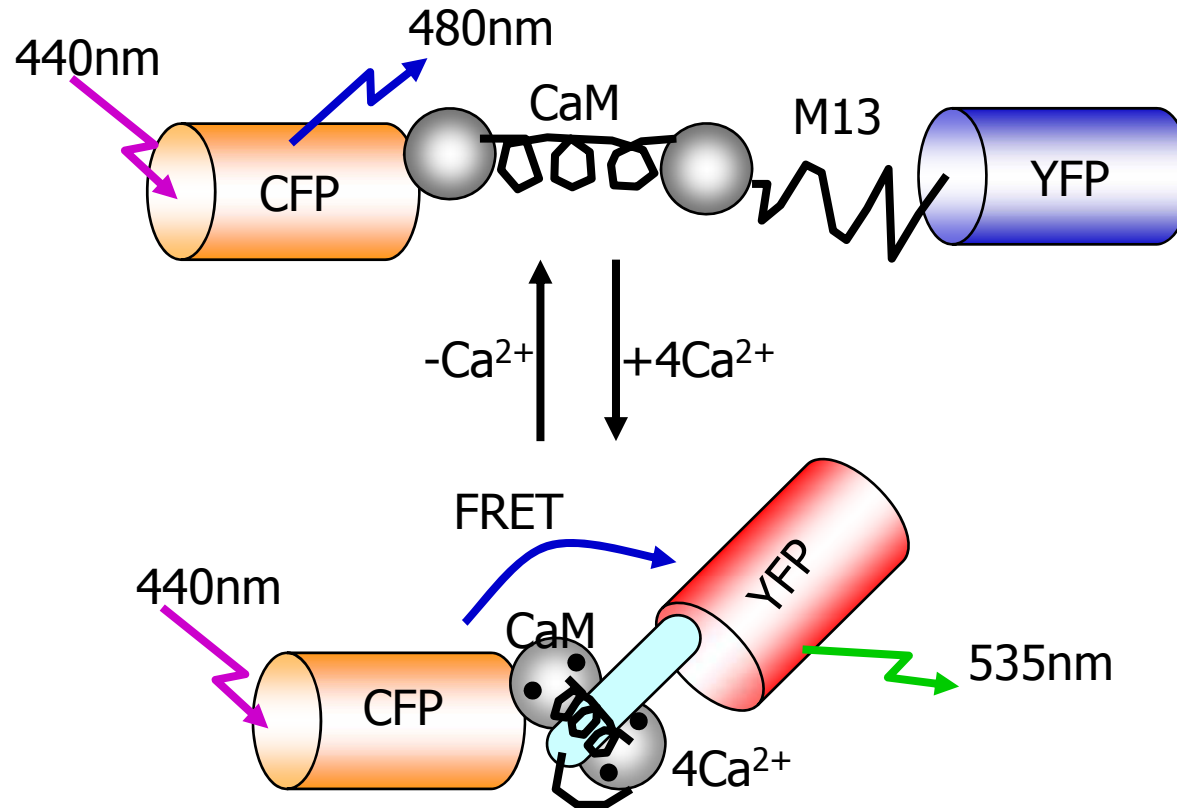
GFPは238個のアミノ酸から構成されるタンパク質

1	MSKGEELFTG	VVPILVELDG	DVNGHKFSVS	GEGEGDATYG	KLTLKFICTT
51	GKLPVPWPTL	VTTFSYGVQC	FSRYPDHMKQ	HDFFKSAMPE	GYVQERTIFY
101	KDDGNYKSRA	EVKFEGDTLV	NRIELKGIDF	KEDGNILGHK	MEYNYNSHNV
151	YIMADKQKNG	IKVNFKIRHN	IEDGSVQLAD	HYQQNTPIGD	GPVLLPDNHY
201	LSTQSALSKD	PNEKRDHMIL	LEFVTAAGIT	HGMDELYK*	

Clontech, Inc.



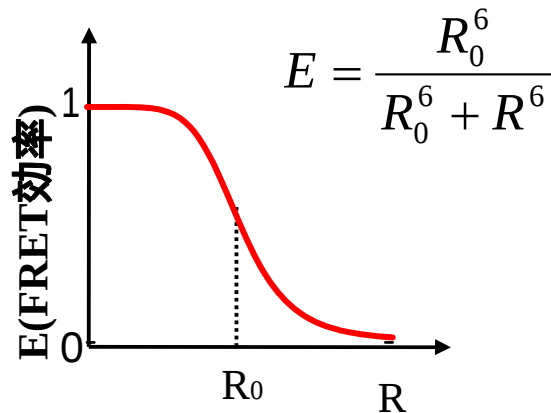
Cameleon Ca^{2+} Indicator



Miyawaki, NATURE, VOL 388, 882 (1997).

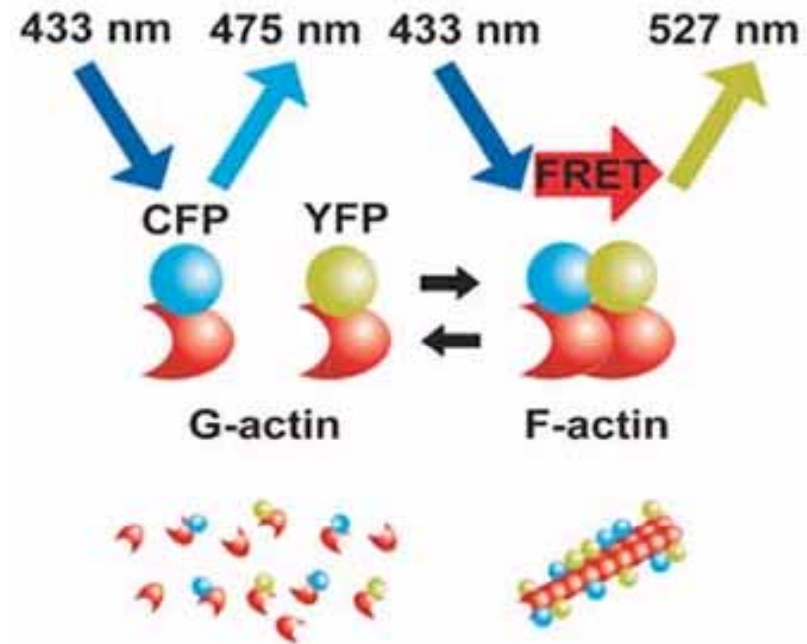
FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) による分子間相互作用の検出

**Fluorescence Resonance
Energy Transfer**
(蛍光共鳴エネルギー移動)



E : FRET効率
R₀ : ドナーとアクセプターの組み
合わせで決まる定数 (~数nm)

・1940年代 Foresterによる理論

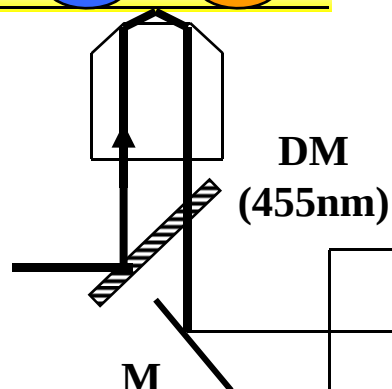
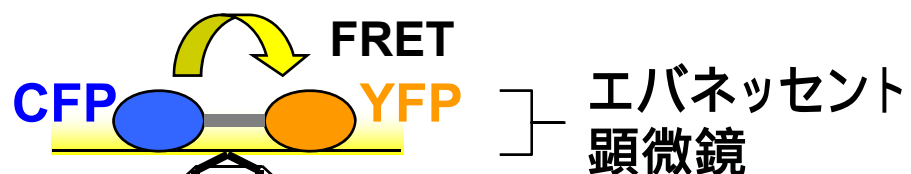


・1990年代 ~

ライフサイエンス分野において、生体分子
の相互作用を計測する手法として応用

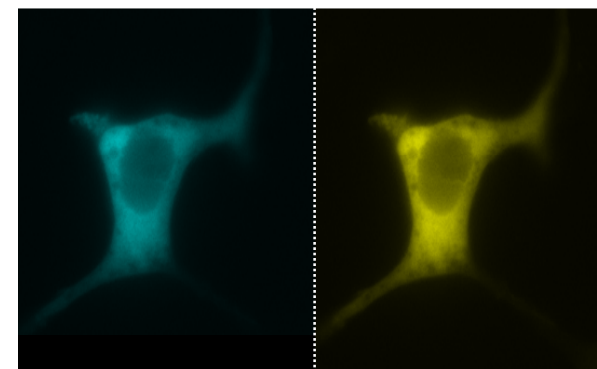
FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) による分子間相互作用の検出

エバネッセント-FRET光学系



CFP

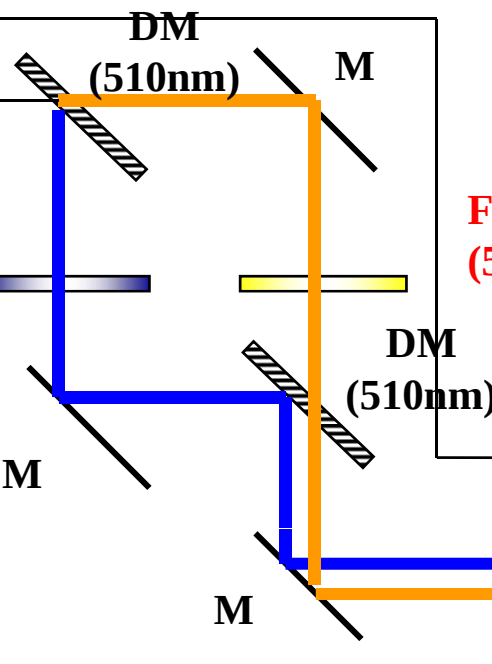
YFP



細胞: HEK 293

遺伝子: cameleon

Filter
(480nm)



Filter
(535nm)

FRET光学系
(浜松フォトニクス)

[nm]	ex	em
ECFP	433	475
EYFP	513	527

CFP

YFP

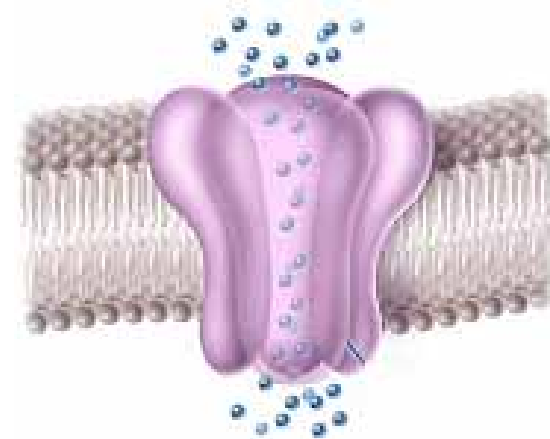
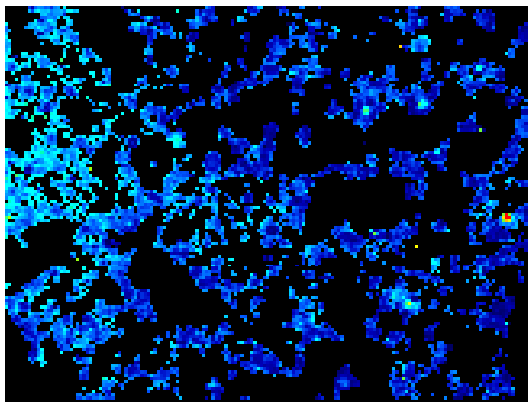
冷イオンチャネルTRP M8

京都大学 情報 小林先生、細川先生との共同研究

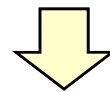
冷イオンチャネルTRP M8

- ・ 冷刺激とメントールに感受性を持つ受容体
(Cell 2002, Nature 2002)
- ・ 6回膜貫通型のイオンチャネル
4量体を形成？

+ Menthol



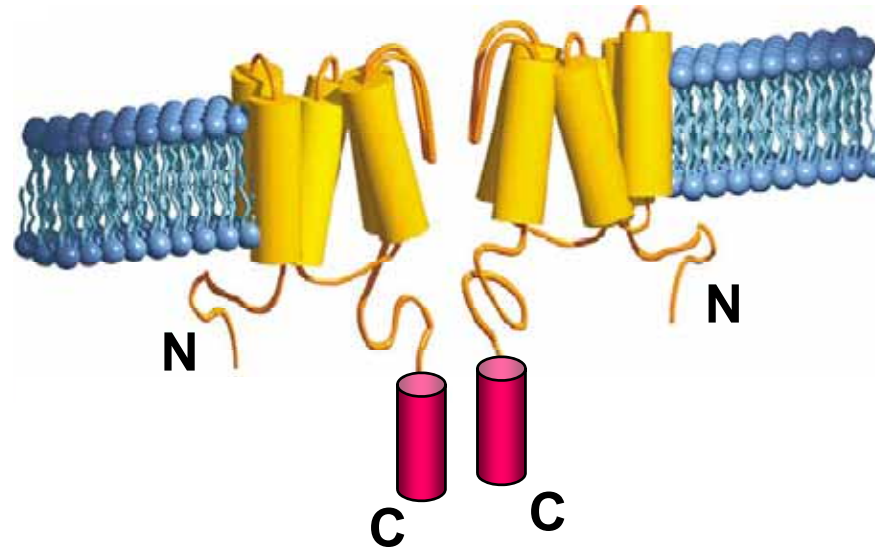
TRP M8 の構造・ダイナミクスに関する研究は進んでいない。



FRET imaging を利用して、TRP M8の構造・ダイナミクスを解析する。

冷イオンチャネルTRP M8の4量体形成における分子機構の解明

冷イオンチャネルTRPM8の4量体形成における分子機構はどうなっているのか？

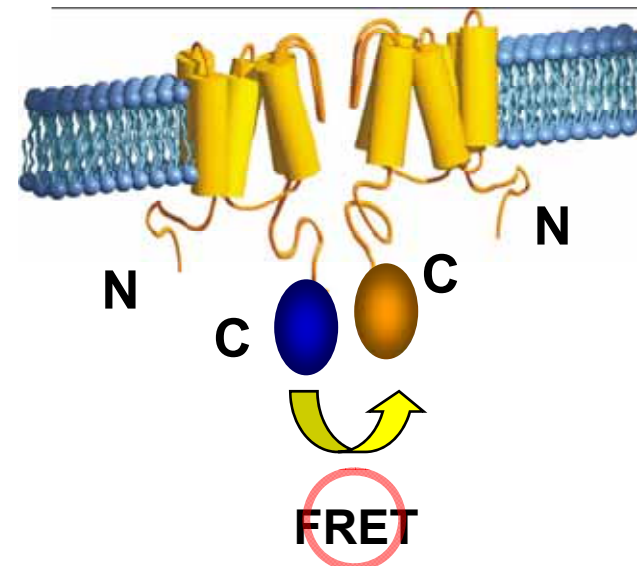
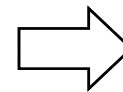
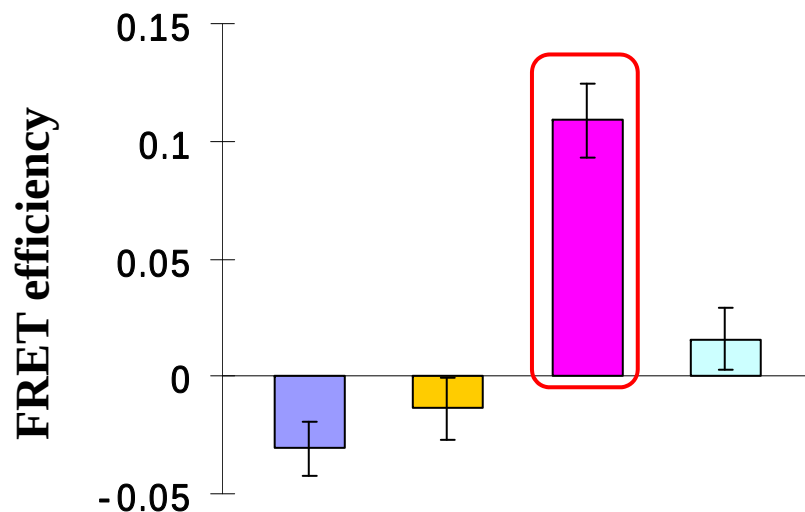
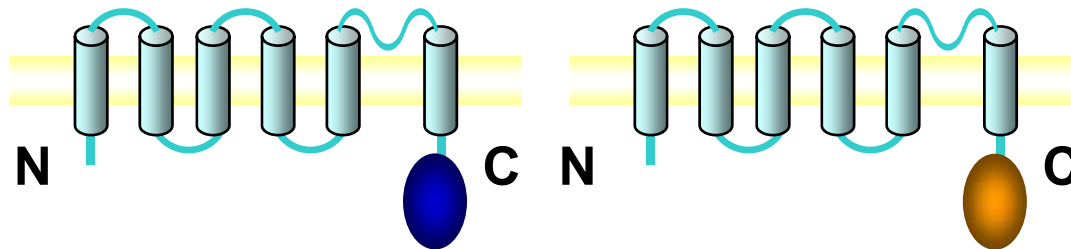


仮説

TRPM8 の分子間相互作用にはCoiled-Coil 領域が重要な働きをしている。

冷イオンチャネルTRP M8の4量体形成における分子機構の解明

TRPM8 のC末端あるいはN末端を蛍光分子で標識し、FRETで分子間相互作用を検出する。



Imaging

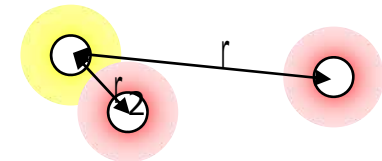
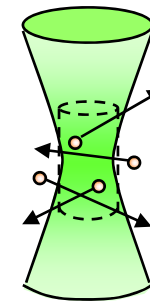
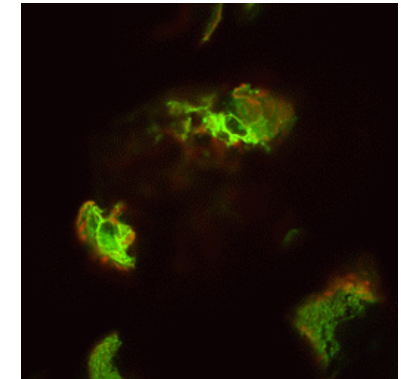
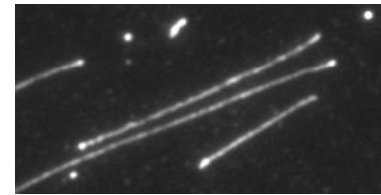
Biology

Informatics

先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

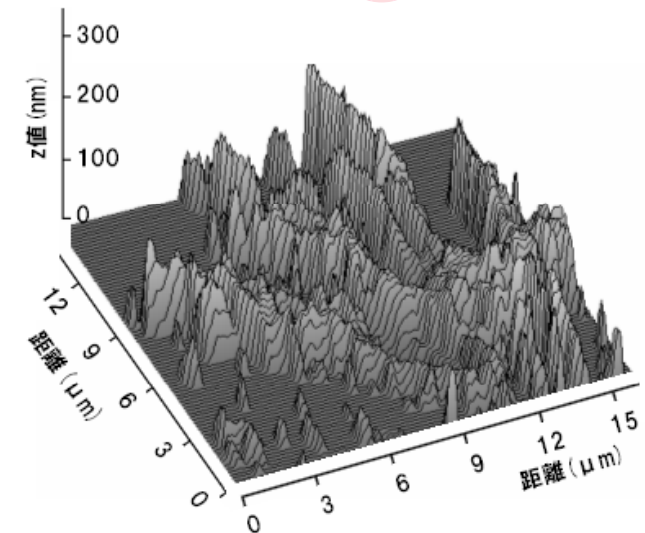
1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング
 - バイオイメージングの基礎
 - 光学顕微鏡、蛍光
 - 共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)
 - 光ピンセットの基礎



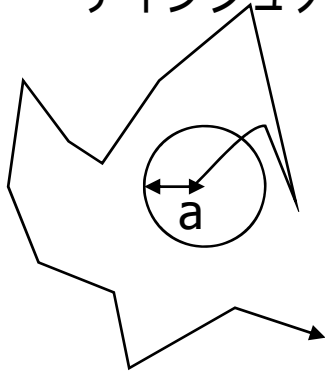
2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測
 - 一分子計測の基礎
 - 一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測
 - 蛍光共鳴エネルギー移動
 - 蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



ブラウン運動

- ・ アインシュタインの関係式 (1905)



$$D = \frac{R T}{N_A} \frac{1}{6\pi\eta a}$$

D: 拡散係数

η : 粘性係数 (水: $1.0 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$)

R: 気体定数 ($8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T: 絶対温度

N_A : アボガドロ数 (6.02×10^{23})

$$\sigma^2 = 2 D t$$

σ : 平均二乗変位

t : 時間

$$\sigma^2 = t \frac{R T}{N_A} \frac{1}{3\pi\eta a}$$

t=1秒では

粒子 ($a=0.5\mu\text{m}$)

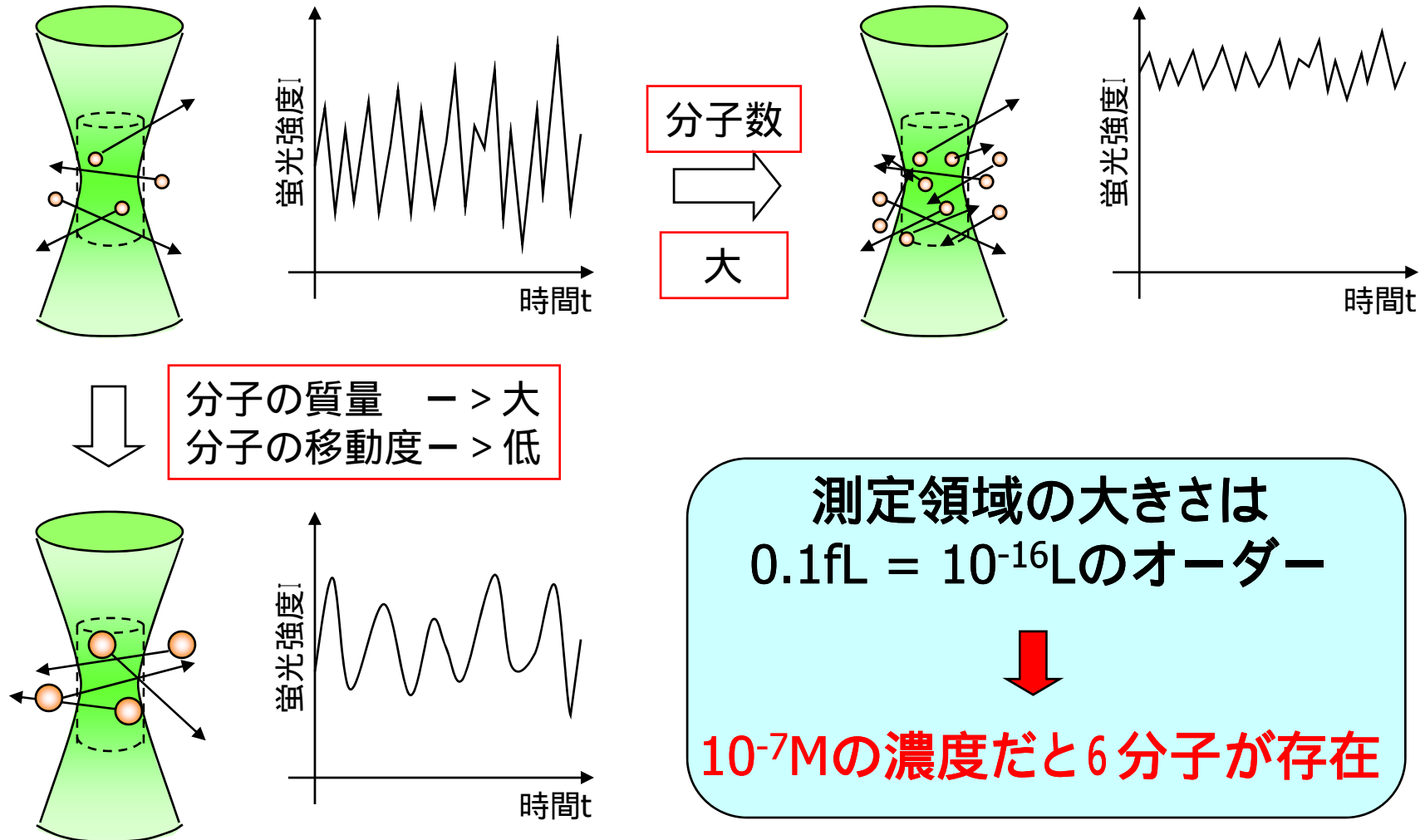
$$\sigma = 0.9\mu\text{m}$$

たんぱく質 ($a=1\text{nm}$)

$$\sigma = 21\mu\text{m}$$

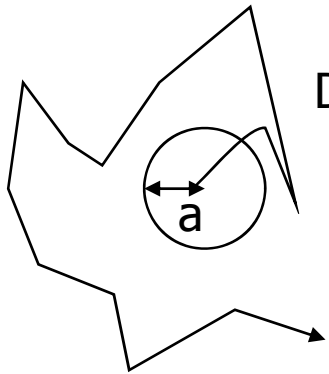
蛍光相関分光法

(FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy)



ブラウン運動

- ・ アインシュタインの関係式 (1905)



$$D = \frac{R T}{N_A} \frac{1}{6\pi\eta a}$$

D: 拡散係数

η : 粘性係数 (水: $1.0 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$)

R: 気体定数 ($8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T: 絶対温度

N_A : アボガドロ数 (6.02×10^{23})

$$\sigma^2 = 2 D t$$

σ : 平均二乗変位

t : 時間

$$\sigma^2 = t \frac{R T}{N_A} \frac{1}{3\pi\eta a}$$

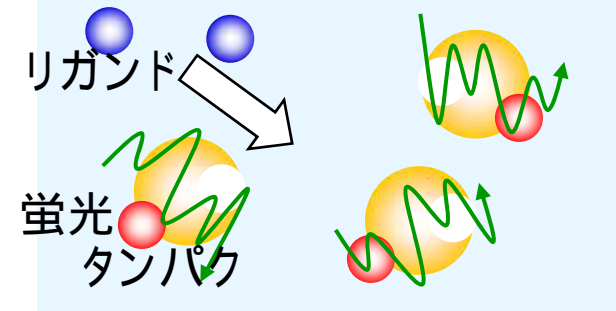
t=1秒では

粒子 ($a=0.5\mu\text{m}$)

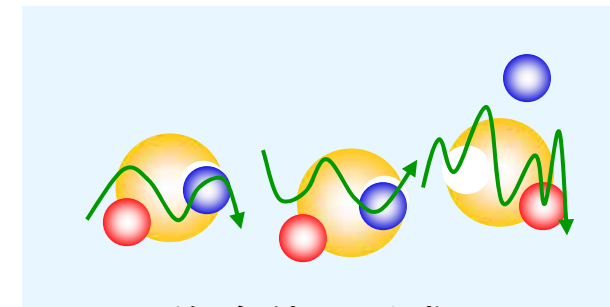
$\sigma = 0.9\mu\text{m}$

たんぱく質 ($a=1\text{nm}$)

$\sigma = 21\mu\text{m}$



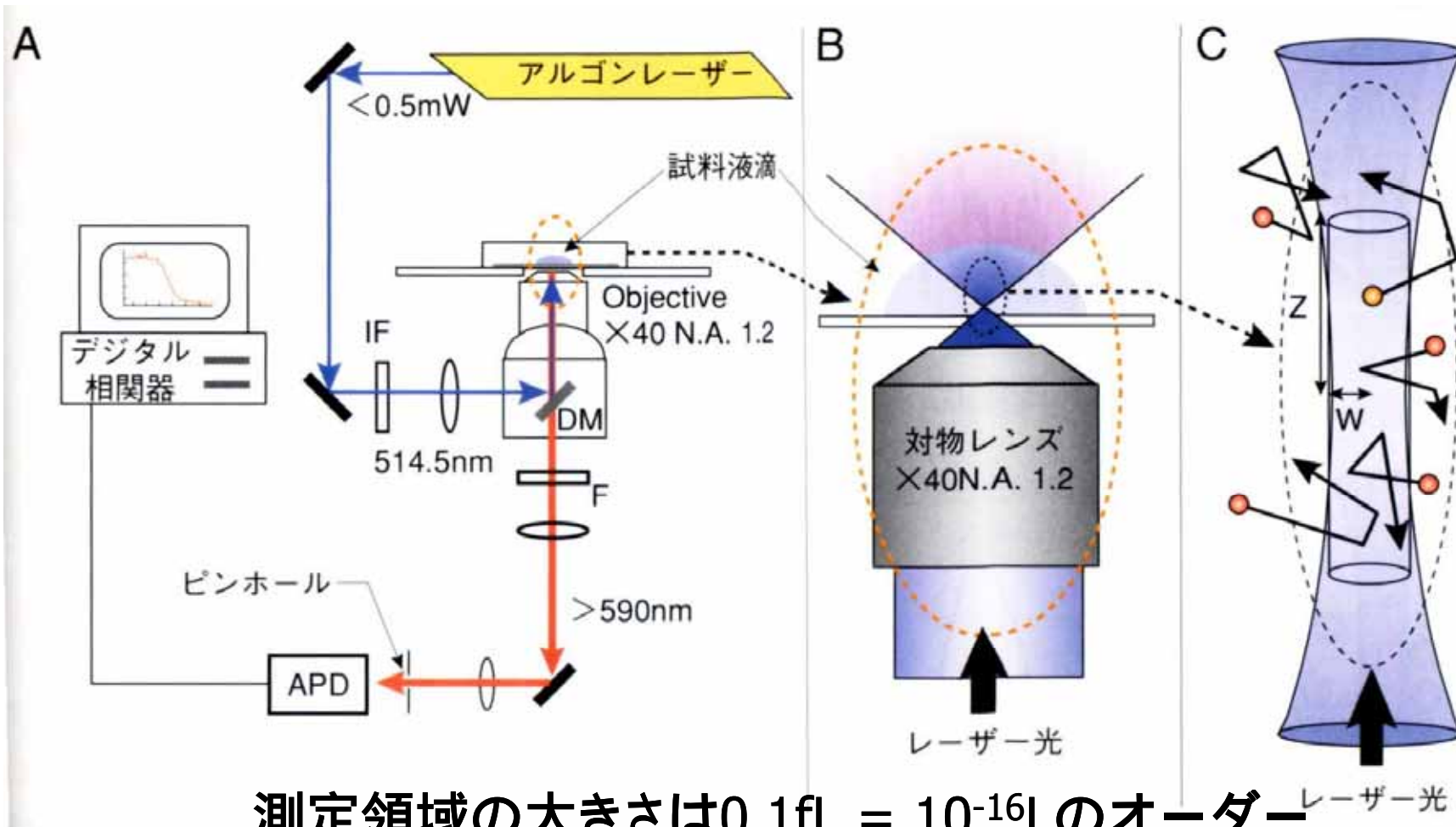
分子間相互作用すると



複合体を形成
ブラウン運動は遅くなる

FCS装置

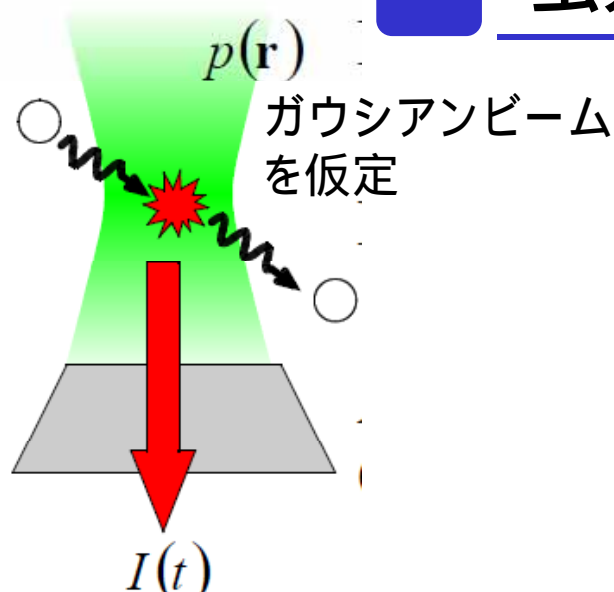
分子間相互作用を計測するのに用いられる



測定領域の大きさは $0.1\text{fL} = 10^{-16}\text{L}$ のオーダー

→ 10^{-7}M の濃度だと6分子が存在

蛍光相関分光法で観測される信号



Diffusion phenomena by Brownian motion

$$dC(\mathbf{r}, t)/dt = D\nabla^2 C(\mathbf{r}, t)$$

Measured intensity

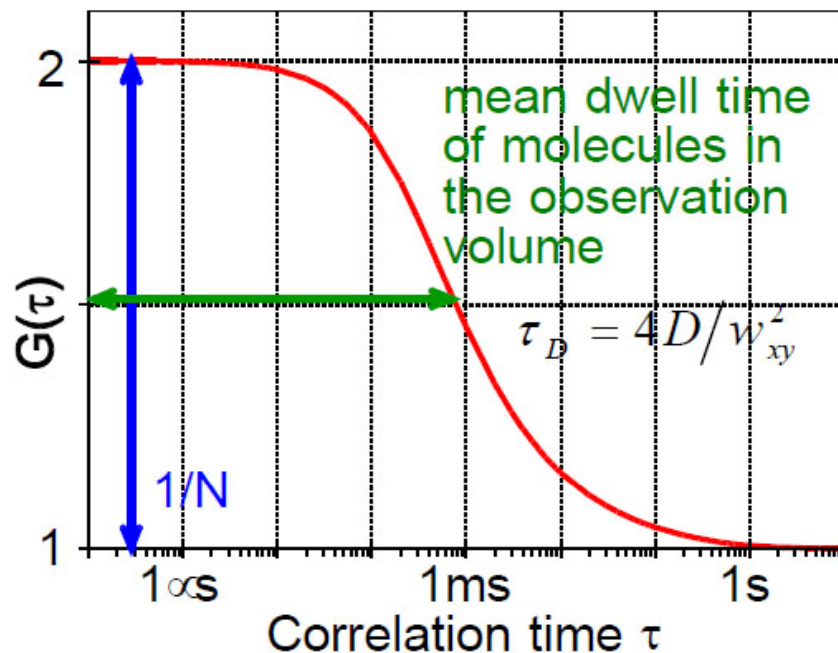
$$I(t) = Q \int q(\mathbf{r}) p(\mathbf{r}) C(\mathbf{r}, t) dV$$

A Gaussian profile

(for general use of FCS)

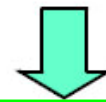
$$p(\mathbf{r}) = I \cdot e^{-2(x^2+y^2)/w_{xy}^2} \cdot e^{-2z^2/w_z^2}$$

Autocorrelation Curve



Autocorrelation function

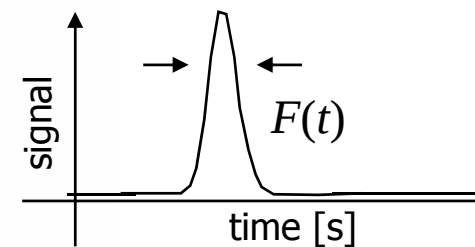
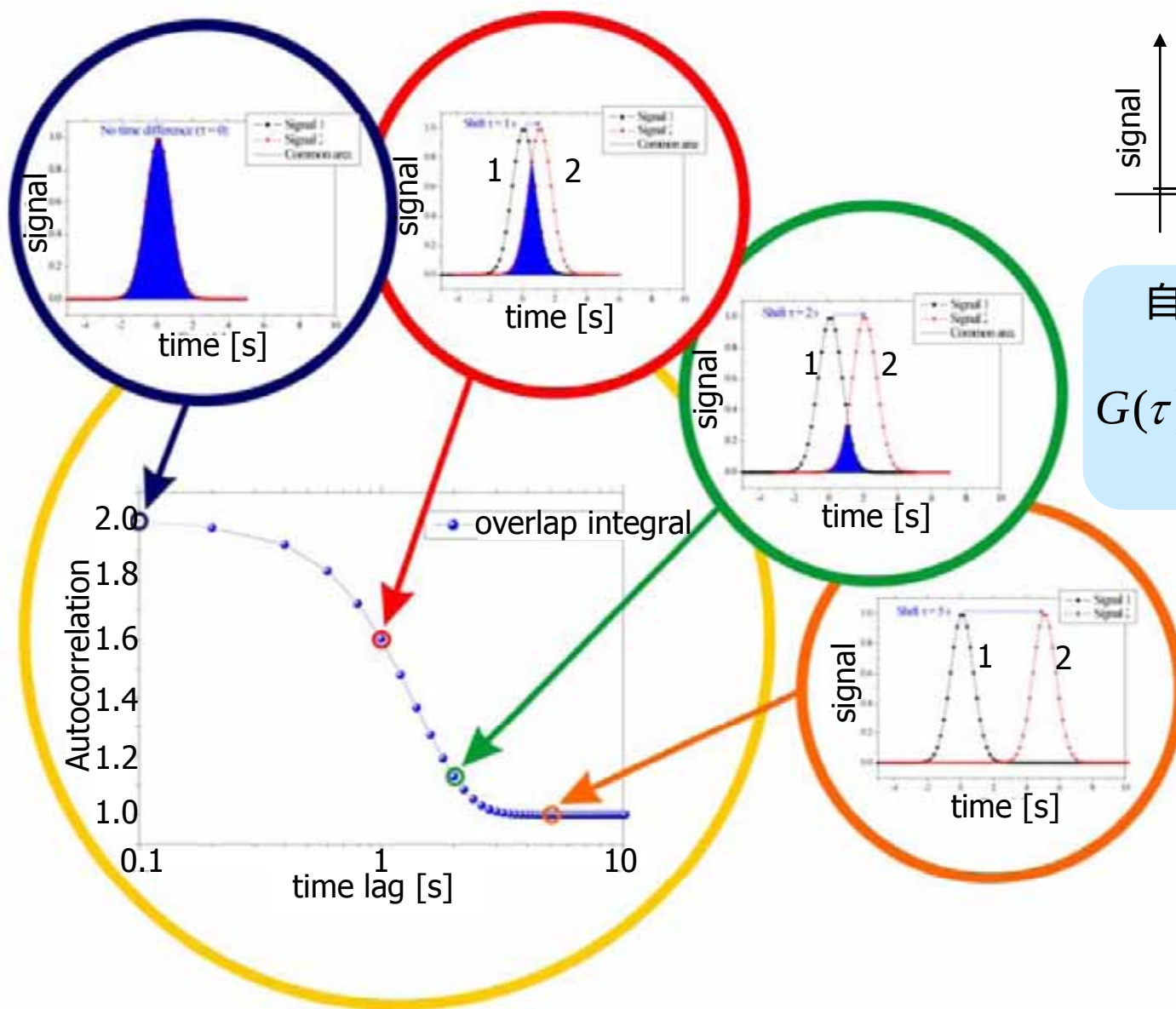
$$G(\tau) = \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle / \langle I(t) \rangle^2$$



$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_{xy}^2} \right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{4D\tau}{w_z^2} \right)^{-1/2}$$

$$G(0) = 1 + \frac{1}{N}$$

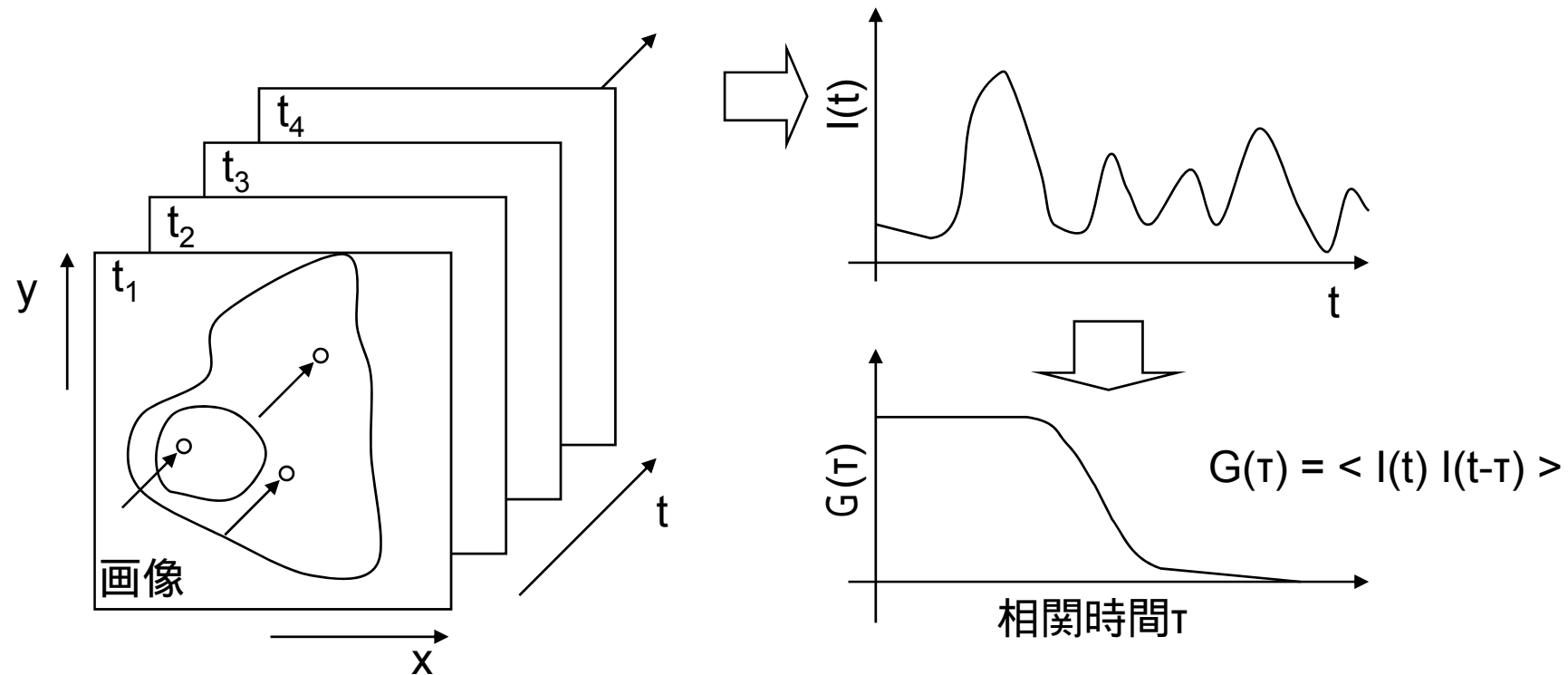
FCS信号の解析 - 自己相関関数 -



自己相関関数 $G(\tau)$

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

1) 各点で相関関数を計算してマッピング



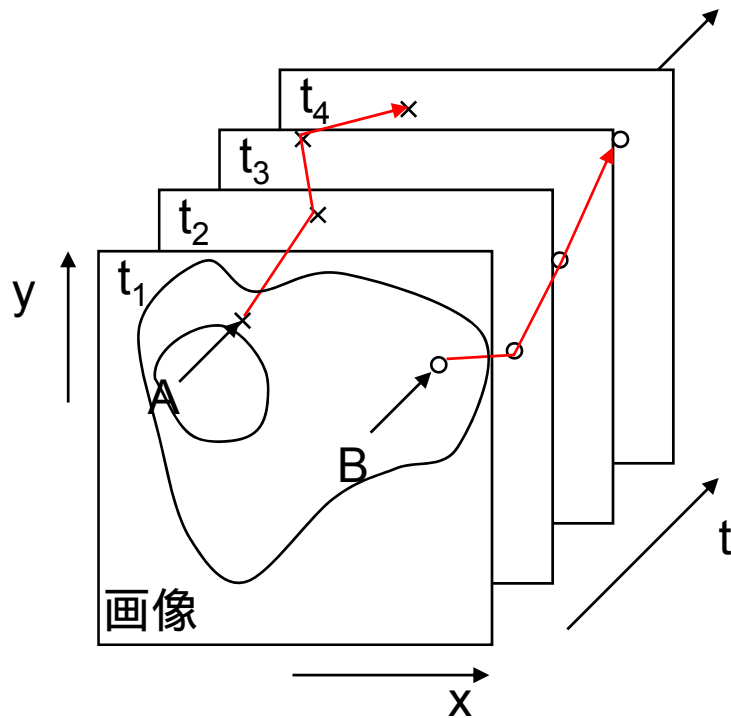
分かること

- ・ 分子の移動度 - > 分子の大きさ、相互作用
- ・ 移動度の分布 - > 局所的な粘性

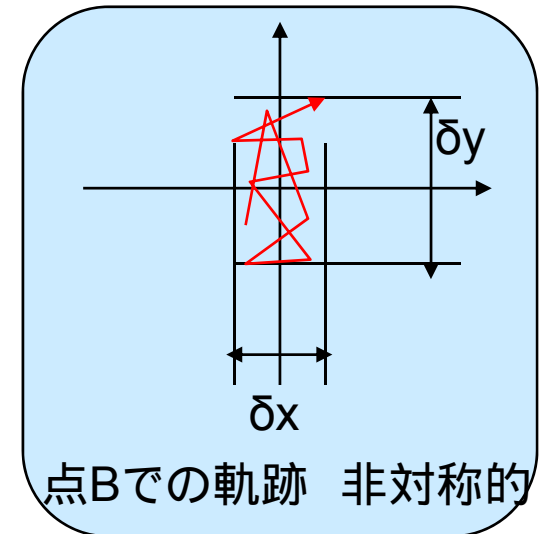
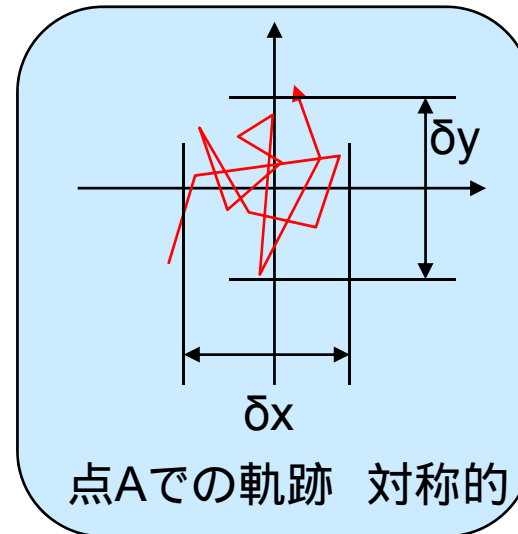
どこで、どのタイミングで、相互作用が起きるかを解析できると、

- > 信号伝達、神経可塑性、がん化のメカニズム 解明につながる
- > 創薬の現場での利用や診断手法への活用なども考えられる

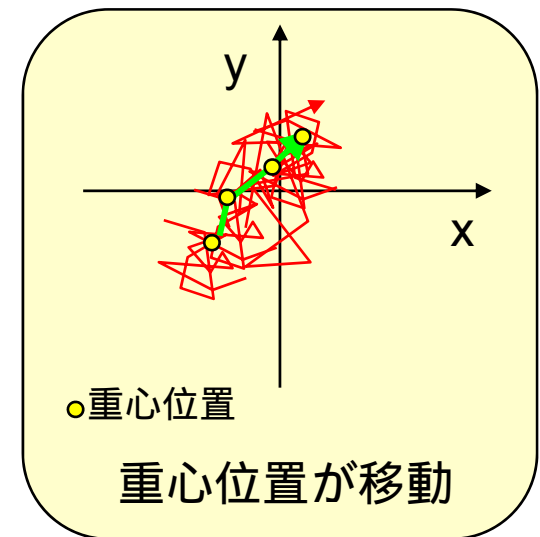
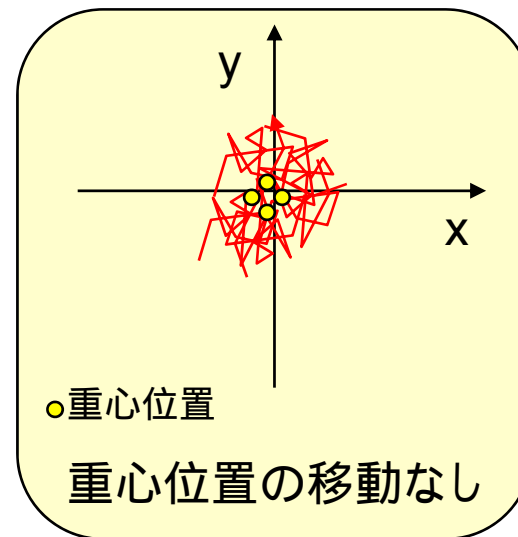
2) 特定の分子の移動を解析



- 細胞内構造
 - DNA (1次元)
 - 膜構造(2次元)
 - コンパートメント(小室)
- 物質輸送
 - 神経軸索
 - 核→小胞体→ゴルジ体→細胞膜

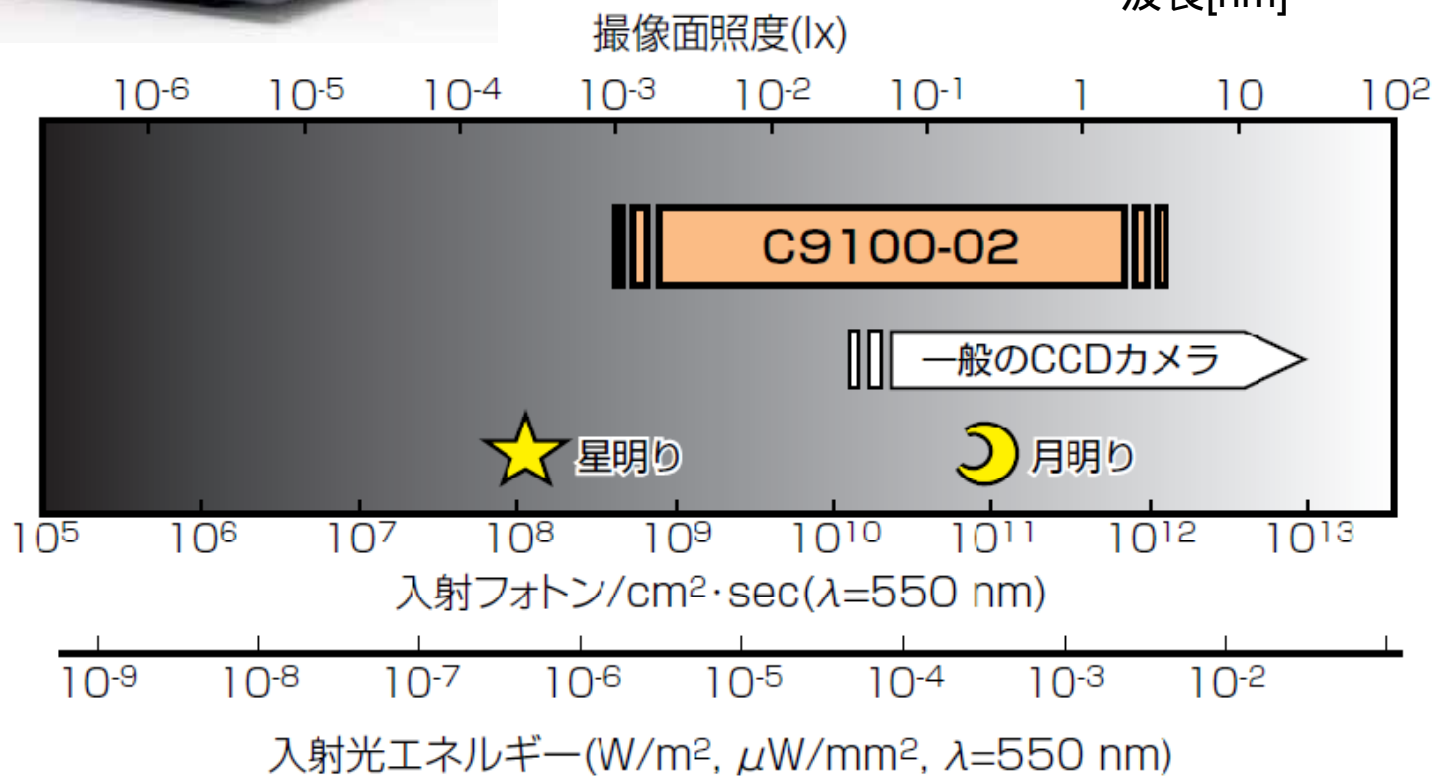
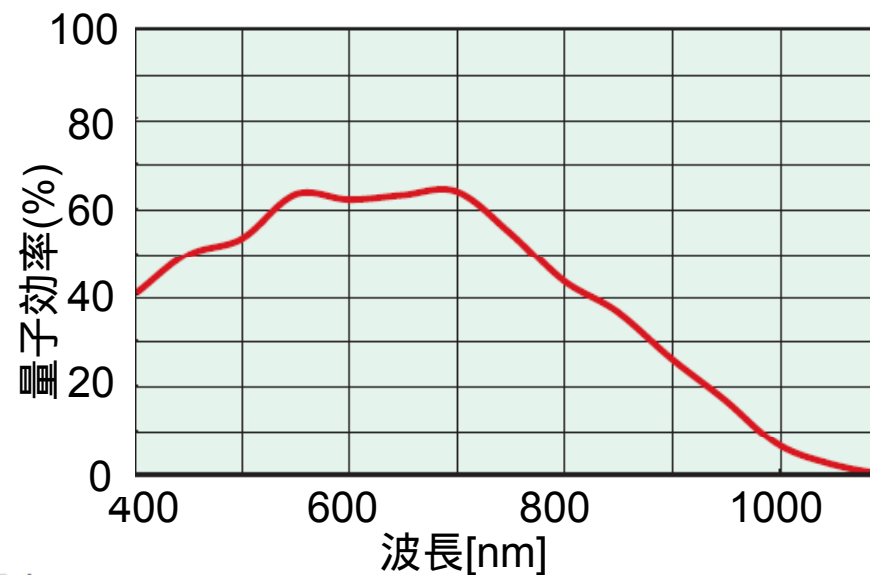


移動の異方性から周辺環境の構造が分かる

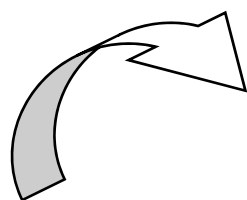


重心位置の移動から分子の輸送動態が分かる

EM-CCDカメラ(浜松ホトニクス) C9100-02



カメラ仕様



43 photon/frame/pixel

下記条件にて得られる、出力画像の標準偏差に等価な入射光量を最低撮像面光量として定義しています。(ビニング動作や露光時間を延ばすことにより、これよりも少ない光量での撮像が可能)

ビニング: 1×1、読み出し速度: 30 フレーム/秒、電子増倍: 最大、入射光: 波長555 nmで平均出力がフルビットの約半分になる均一な光量。

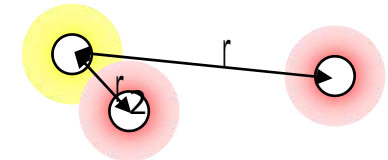
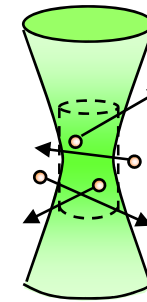
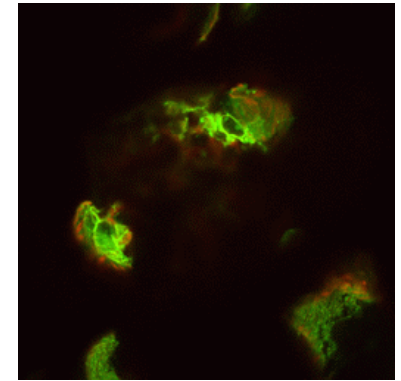
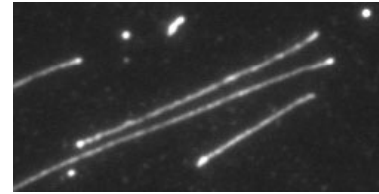
最低撮像面光量を $1 \text{ W/m}^2 = 680 \text{ lx}$ として換算した値。

型名	C9100-02	
カメラヘッドタイプ	真空封じ切り空冷ヘッド	
撮像素子	電子増倍型 フレームトランスファ CCD	
有効画素数	1000 (H) × 1000 (V)	
画素サイズ	8.0 μm (H) × 8.0 μm (V)	
有効素子サイズ	8.0 mm (H) × 8.0 mm (V)	
ピクセルクロックレート	35 MHz / pixel	
最低撮像面光量 (555 nm) (typ.) ①	$6 \times 10^{-6} \text{ W/m}^2$	
最低撮像面照度 (typ.) ②	$4 \times 10^{-3} \text{ lx}$	
読み出し速度 (下記参照)	30.1 フレーム/秒 ~ 520.8 フレーム/秒	
読み出しノイズ (r.m.s.) typ.	電子増倍最小時	10 electrons
	電子増倍最大時	< 1 electron
飽和電荷量 (typ.)	70 000 electrons	
冷却方式	ペルチェ冷却・強制空冷+真空封じ切り	
冷却温度	- 50 °C (周囲温度: 0 °C ~ +40 °C)	
露光時間③	内部同期モード	100 マイクロ秒 ~ 10 秒
	外部トリガモード	100 マイクロ秒 ~ 10 秒
電子シャッタ	可能	
A/Dコンバータ	14 bit	
出力信号/外部制御	Camera Link	
サブアレイ読み出し	サイズ、位置を16ライン単位 (水平、垂直) で設定可能 (下表参照)	
ビニング読み出し	2×2、4×4、8×8、16×16 (右表参照)	
外部トリガ	可能	
オフセット	可能	

先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

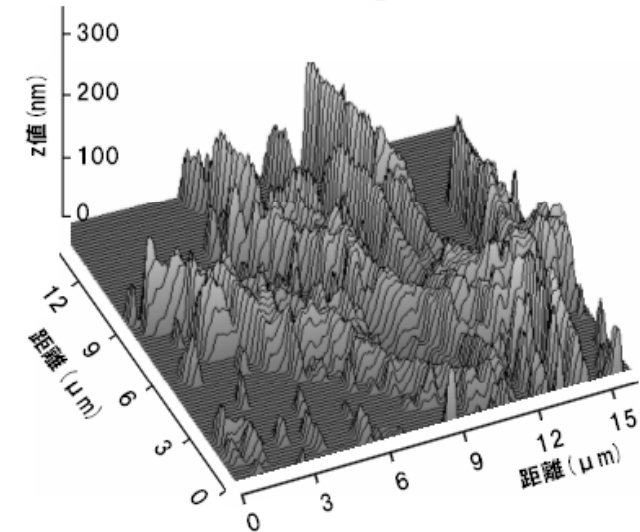
1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング
 - バイオイメージングの基礎
 - 光学顕微鏡、蛍光
 - 共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)
 - 光ピンセットの基礎



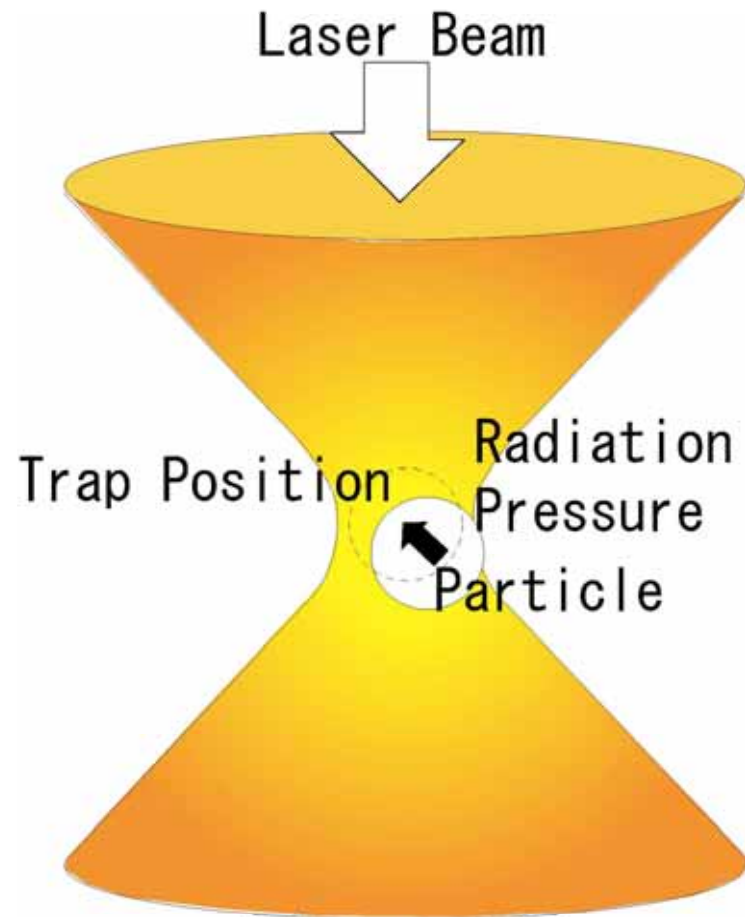
2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測
 - 分子クラッチの計測
 - 一分子DNAの力学特性計測
 - 一分子間相互作用計測



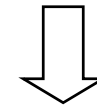
レーザートラッピング、光ピンセット (Optical Tweezers)

光の放射圧で微粒子を捕捉して操作する技術

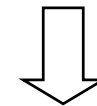


Particle: 40nm to 10 μ m\)

Radiation Pressure by Laser



Trapped at Beam Spot
(Optical Tweezers)



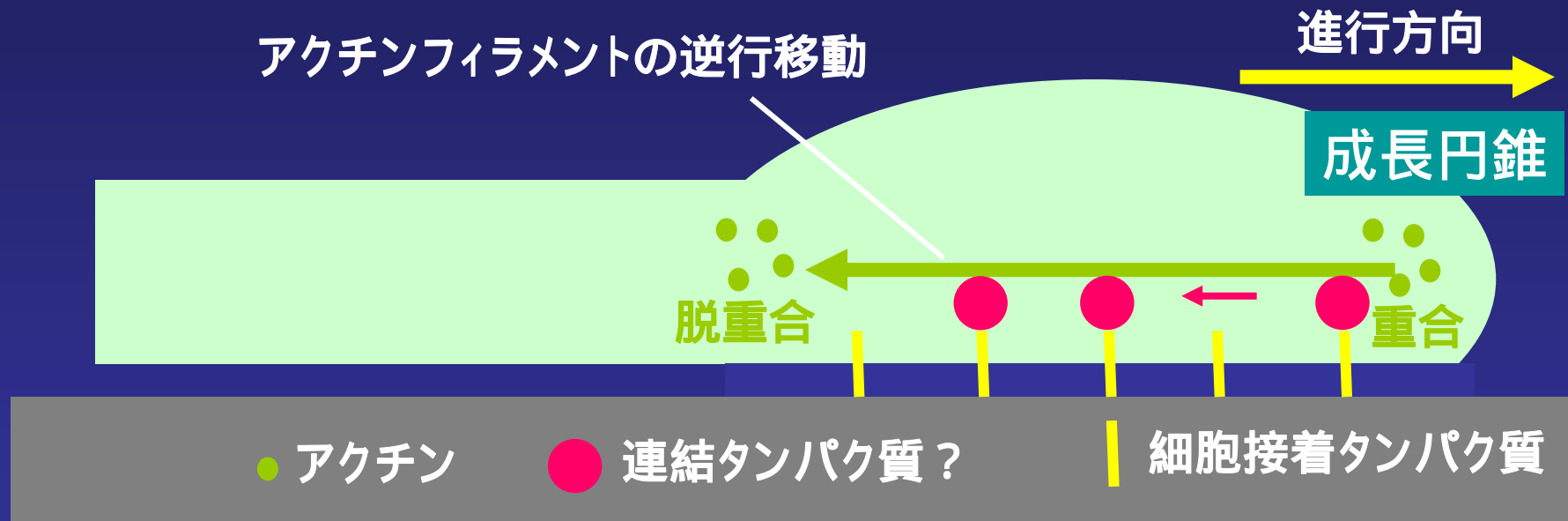
Manipulation of a Cell etc.
under Microscope

Shootin1が軸索を伸ばす分子機構

奈良先端大 バイオサイエンス研究科 稲垣直之先生との共同研究

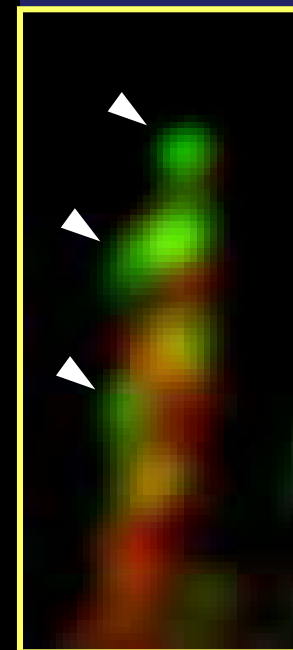
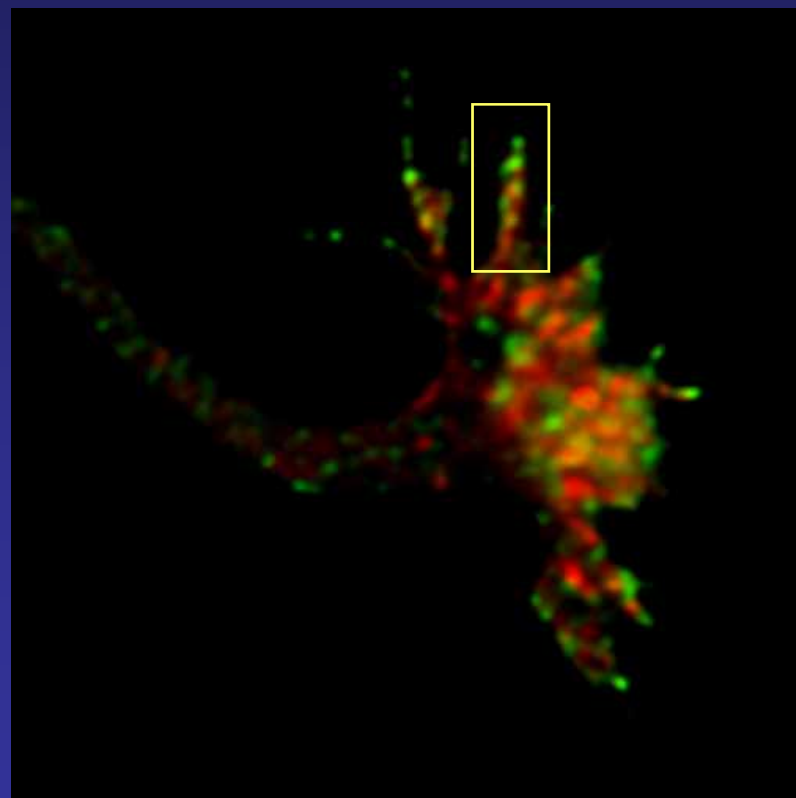
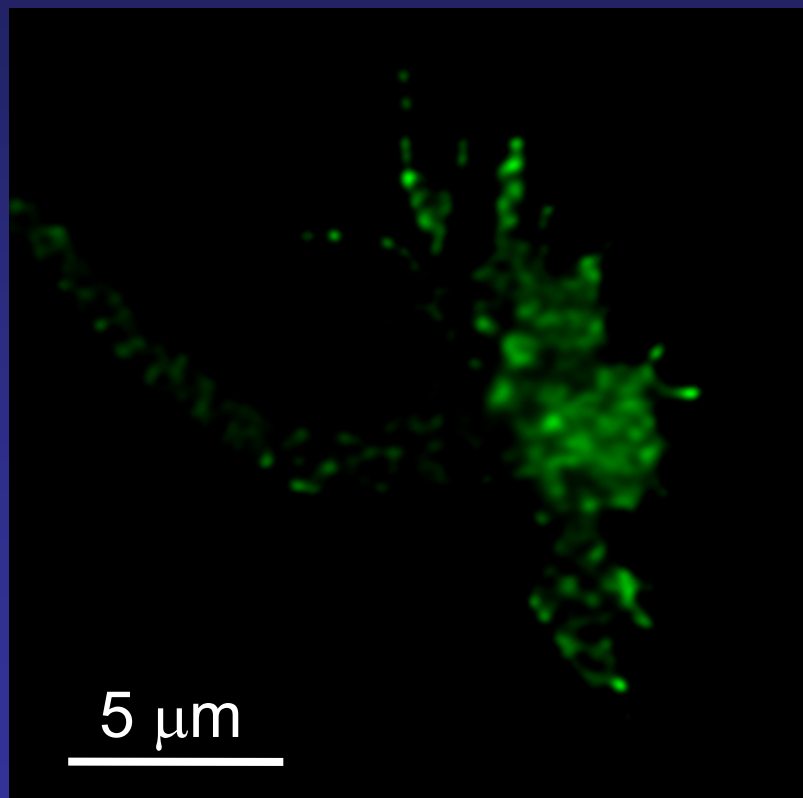
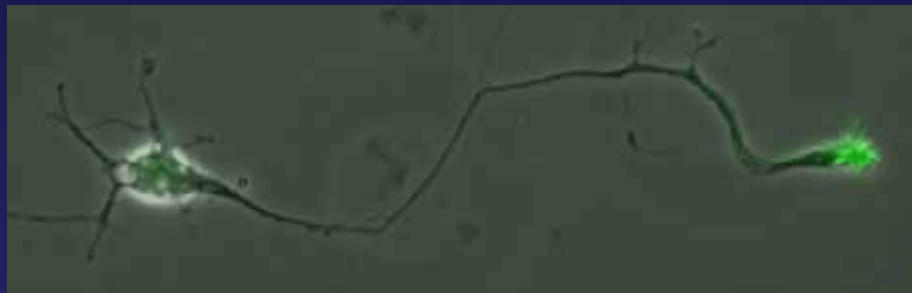
クラッチ仮説:

アクチンフィラメントの逆行移動と
細胞接着タンパク質の連結が推進力を生み出す？



Mitchison & Kirschner, *Neuron* 1, 761 (1988)

Shootin1は軸索の成長円錐に濃縮する



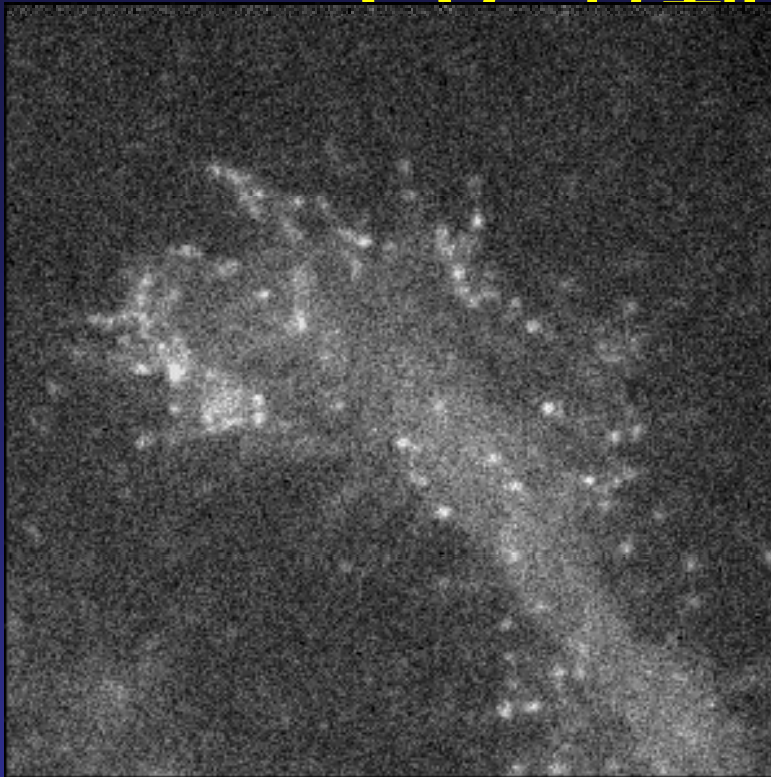
Green : Shootin1

Red : F-actin

Shootin1はアクチンフィラメントと付 いたり離れたりする

EGFP-Shootin1の1分子計測像
(京都大学・医
渡邊直樹先生との共同研究)

進行方向

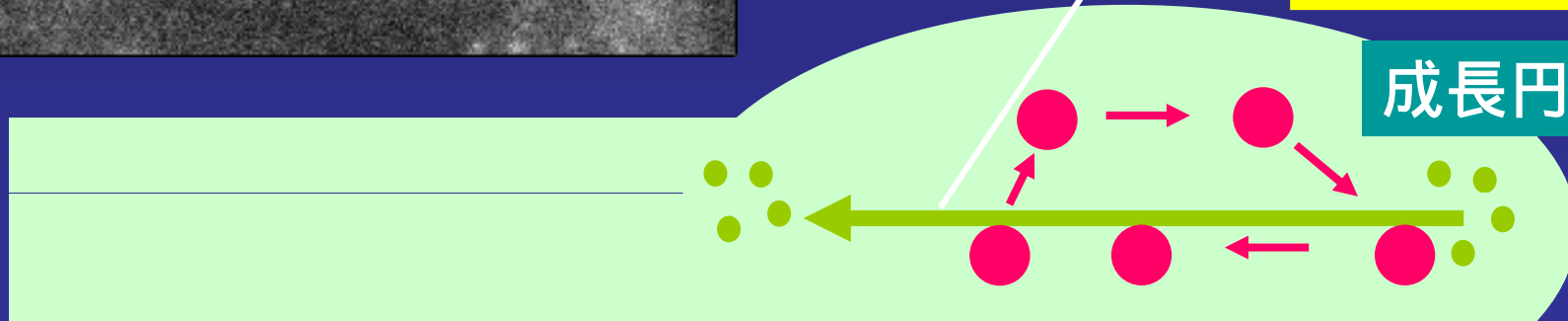


アクチンフィラメントの
逆行移動

進行方向



成長円錐



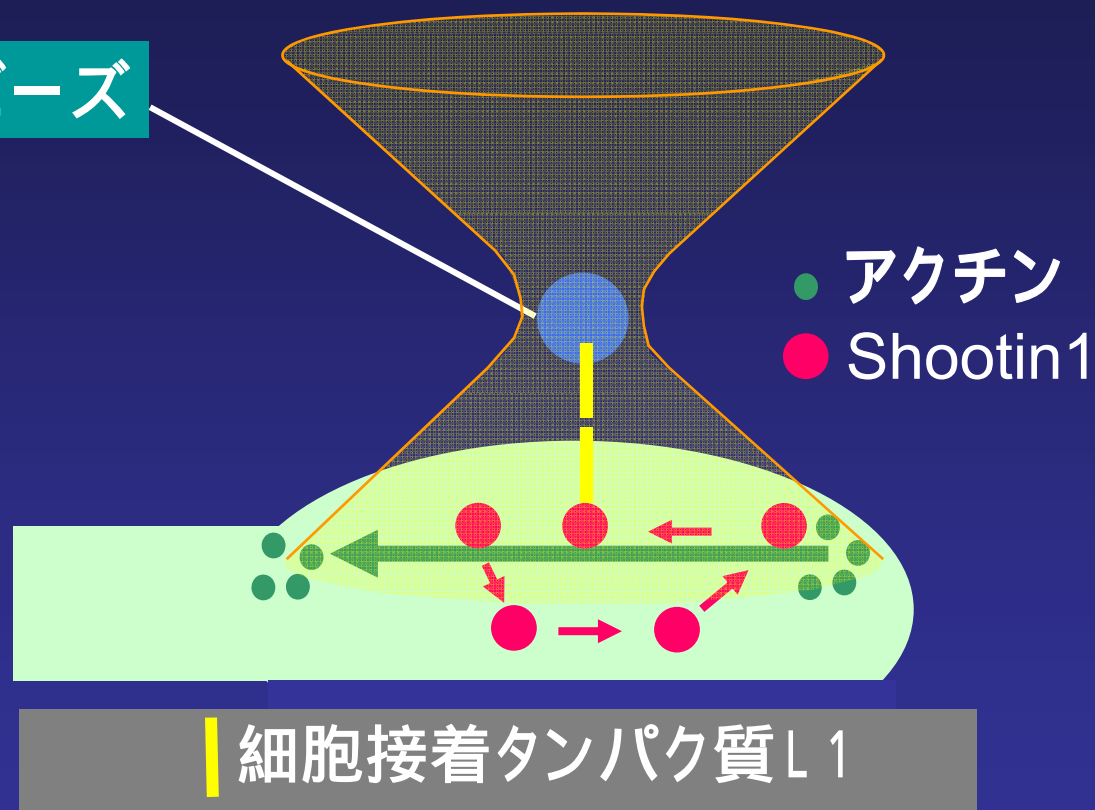
● アクチン

● Shootin1

Shootin1を介した軸索成長円錐上のL1の動きを計測

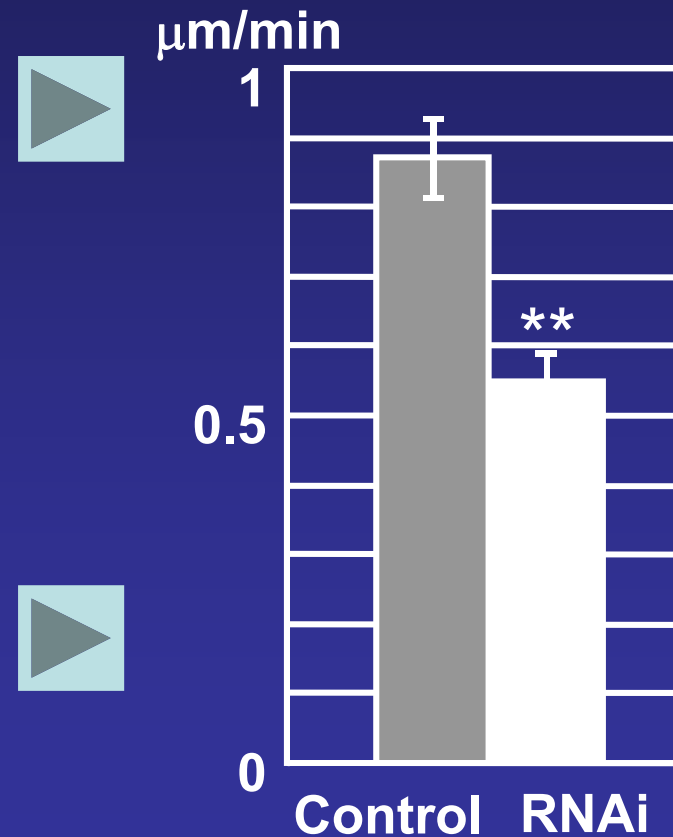
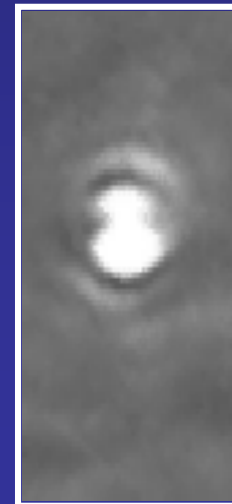
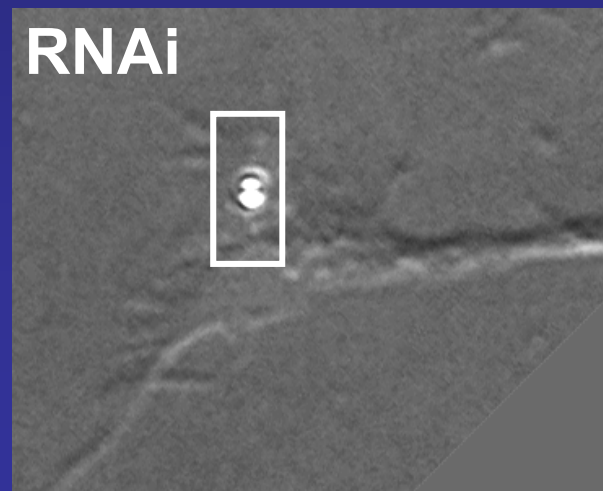
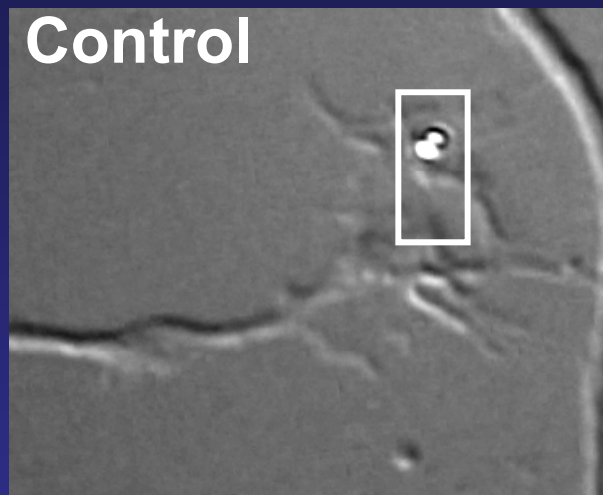
L1でコートした1 μ mビーズ

レーザーピンセット



(奈良先端大学・情報科学研究科・杉浦忠男先生との共同研究)

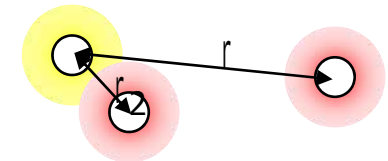
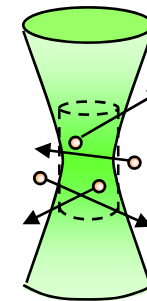
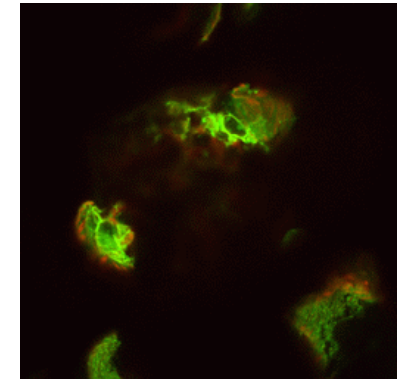
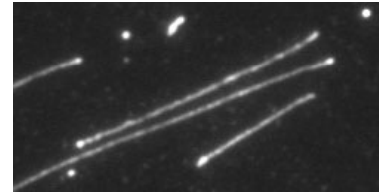
Shootin1の発現量を抑制すると L1の動きが遅くなる



先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

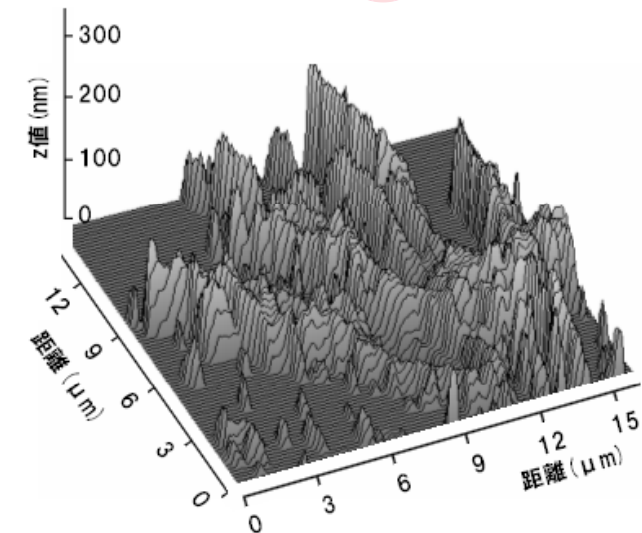
1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング
 - バイオイメージングの基礎
 - 光学顕微鏡、蛍光
 - 共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)
 - 光ピンセットの基礎



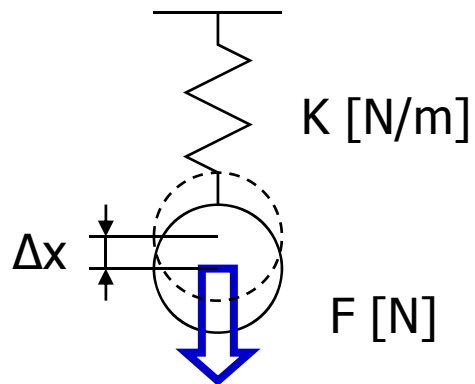
2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測
 - 分子クラッチの計測
 - 一分子DNAの力学特性計測
 - 一分子間相互作用計測

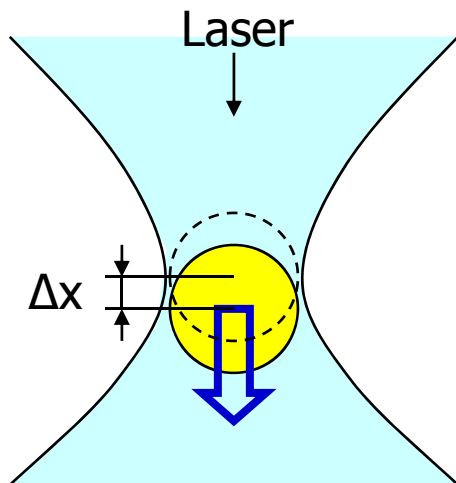


基本は「バネ秤」

$$\vec{F} = K \Delta \vec{x}$$



K	バネ定数	[N/m]
Δx	変位	[m]
F	力	[N]



力の感度を高める(最小検出力を小さくする)には

- ・バネ定数 小
- ・最小検出 Δx

典型的な値

光ピンセット

・バネ定数 $\sim \mu\text{N/m}$

・変位 Δx $\sim 0.1\text{nm}$

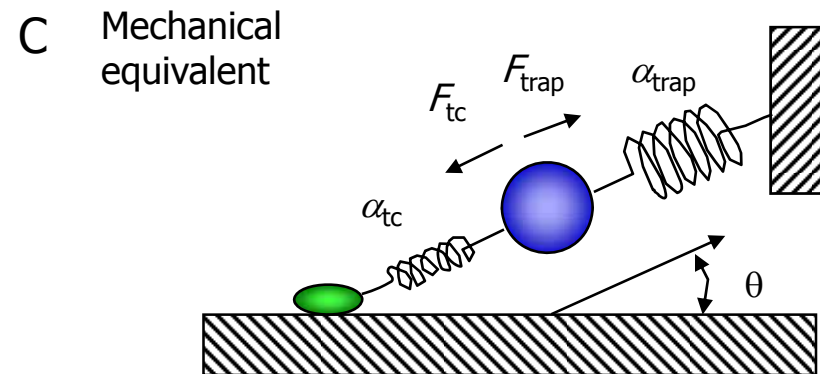
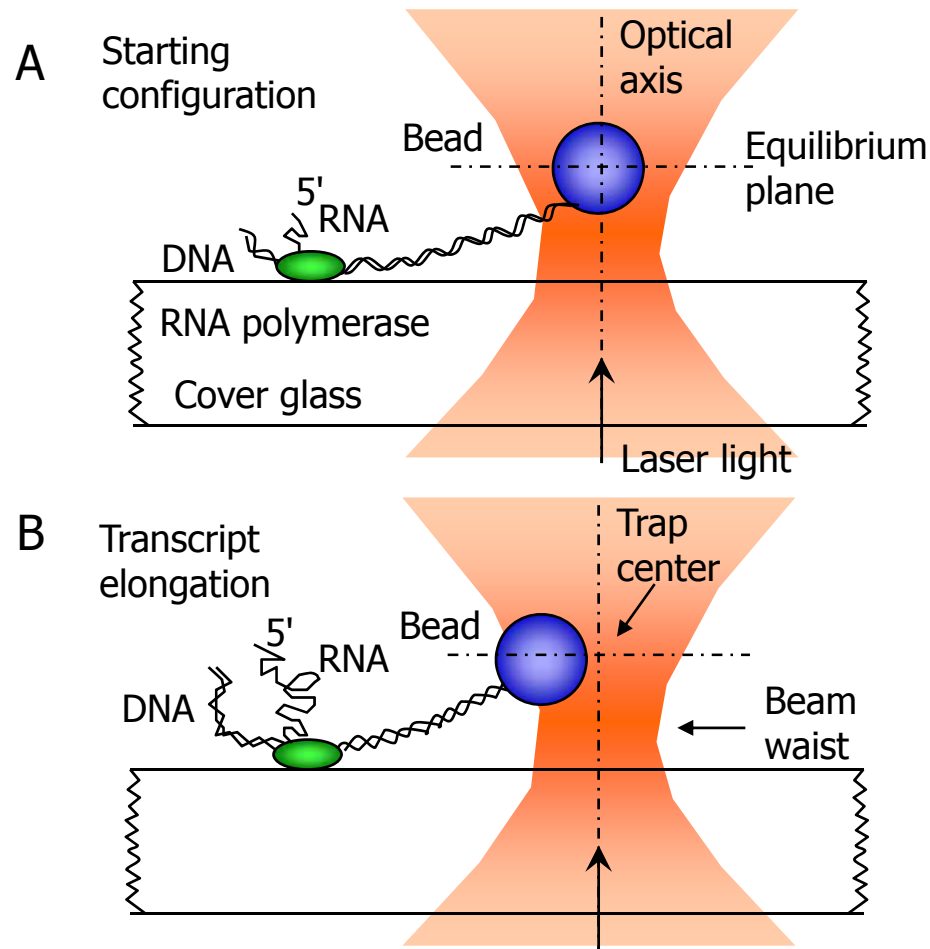
AFM(原子間力顕微鏡)

・バネ定数 $\sim \text{mN/m}$

・変位 Δx $\sim 0.01\text{nm}$

Transcription Against an Applied Force

H. Yin, S. M. Block, Science (1995)



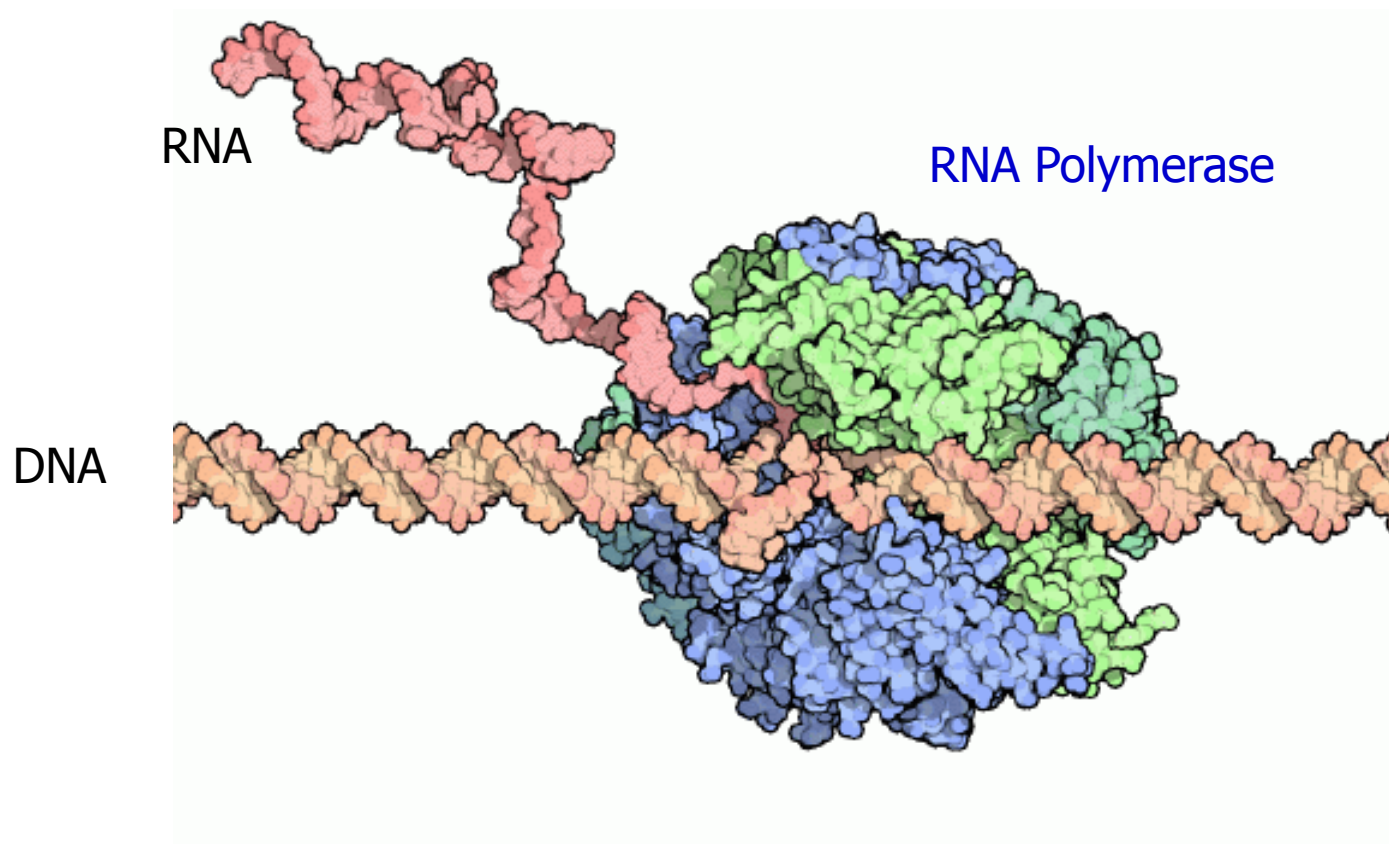
RNA Polymerase

DNA $\xrightarrow{\quad}$ mRNA $\rightarrow$ Protein

RNA Polymerase

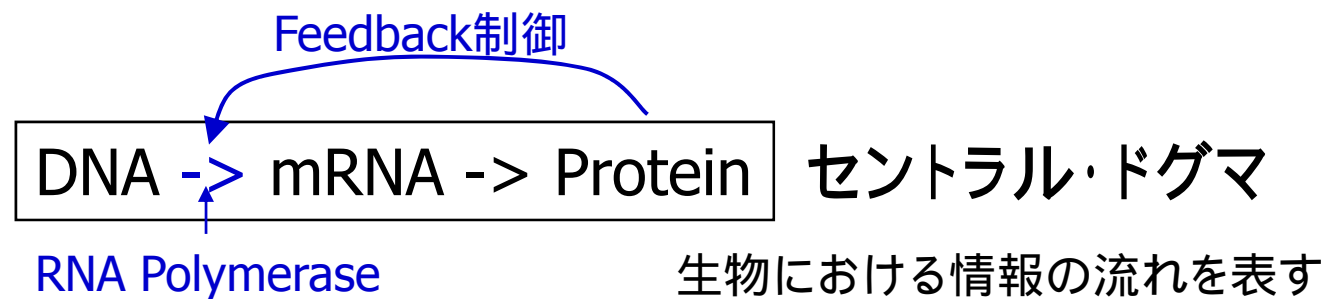
セントラル・ドグマ

生物における情報の流れを表す

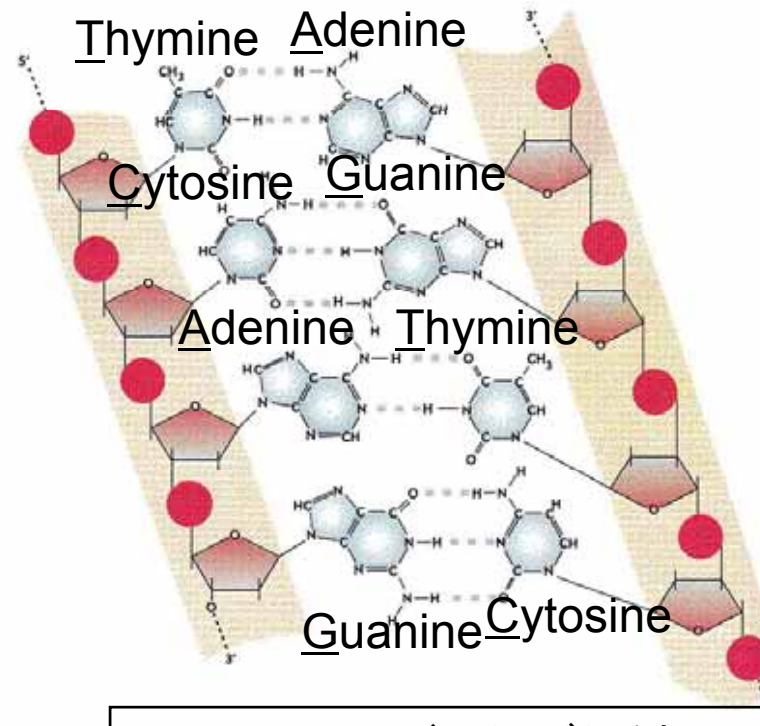
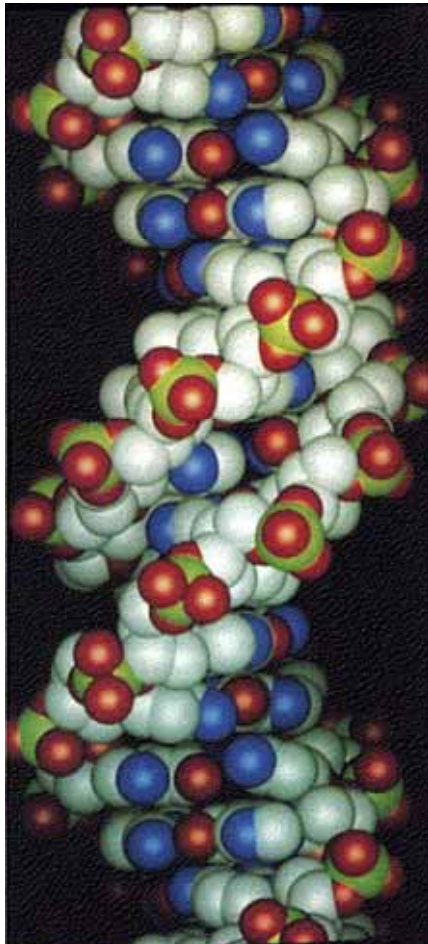


RNA Polymeraseの実験の意義

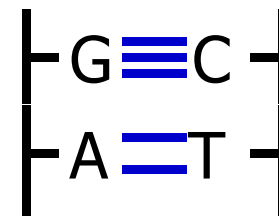
- RNA Polymerase がDNAを引く力(メカニズム)が分かる
 - アクティブに引く力を発生するメカニズムの解明
- 分子間相互作用についての知見が得られる
 - DNA-RNA間相互作用の解明
- 転写制御について知見が得られる
 - RNAが転写をはじめるメカニズムなど
 - これから転写制御のメカニズムが分かる



DNAの構造



(A-T)、(G-C)がそれぞれ対になった
二重らせん構造

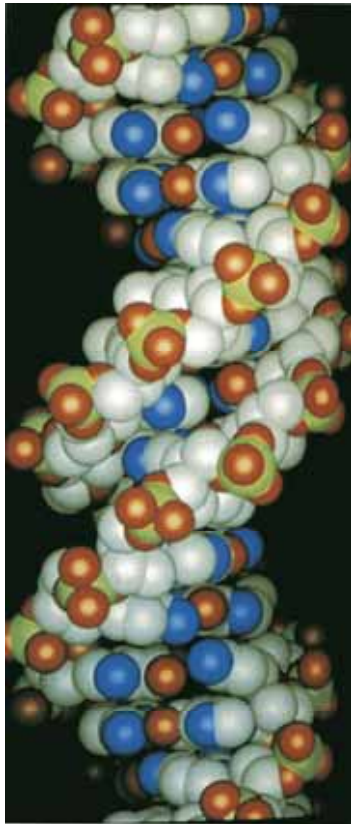


水素結合の本数が異なる！

- > 結合力が異なる

DNAの構造

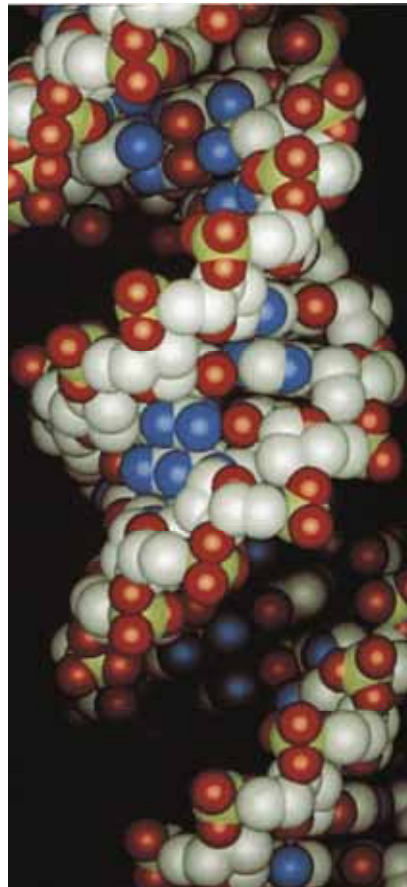
- B DNA



1回転
10塩基
3.4nm

右巻き
直径: 2.0 nm

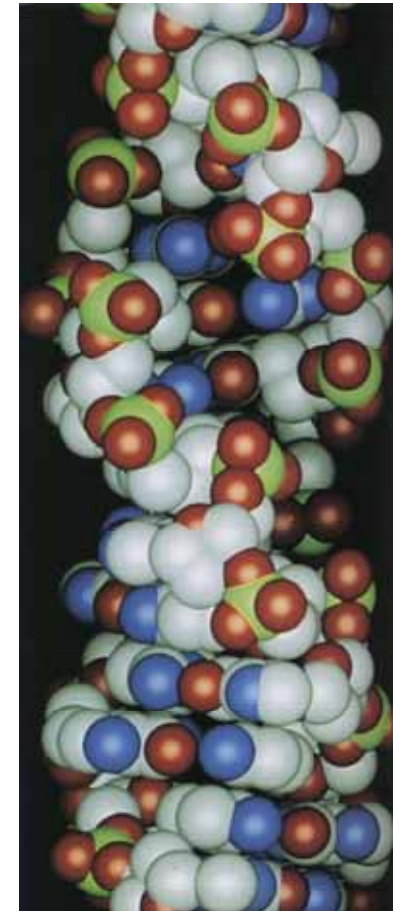
- A DNA



1回転
11塩基
2.8nm

右巻き
直径: 2.6 nm

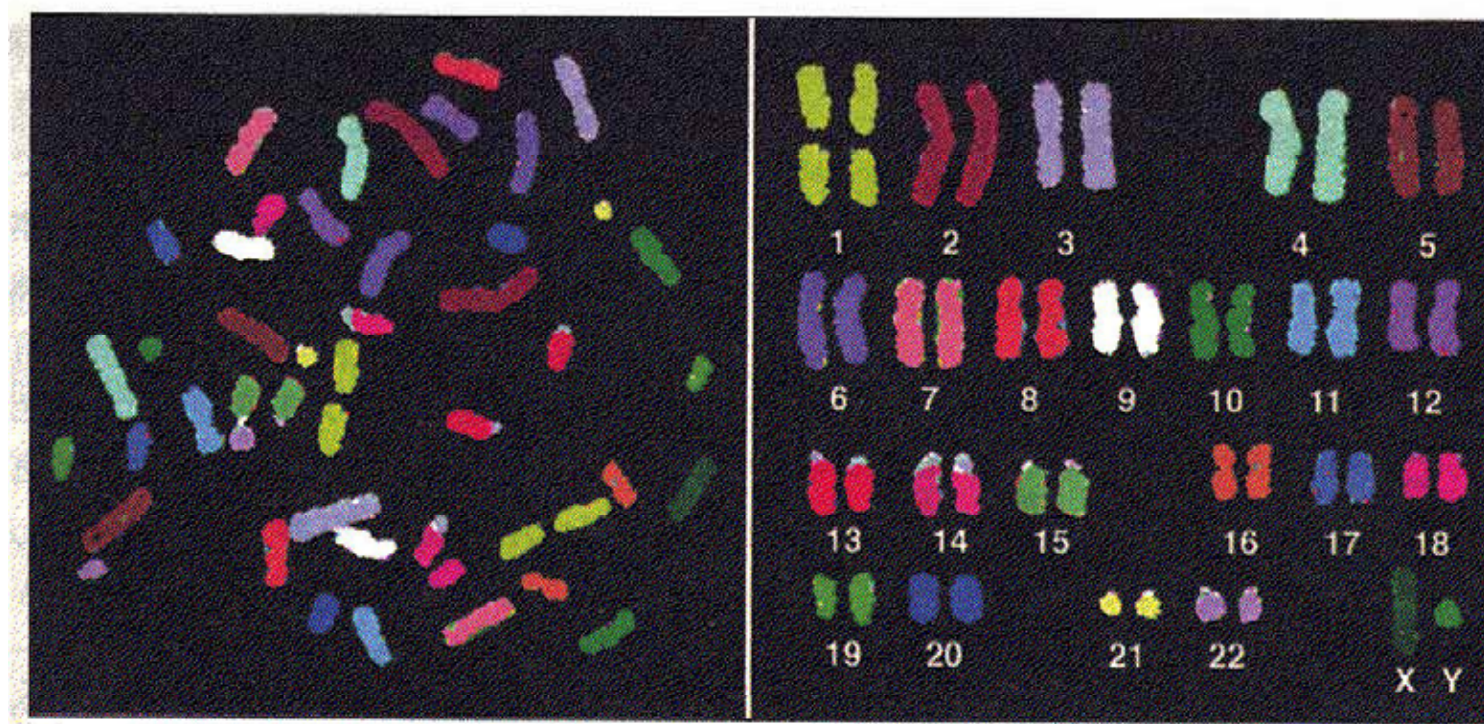
- Z DNA



1回転
12塩基
4.5nm

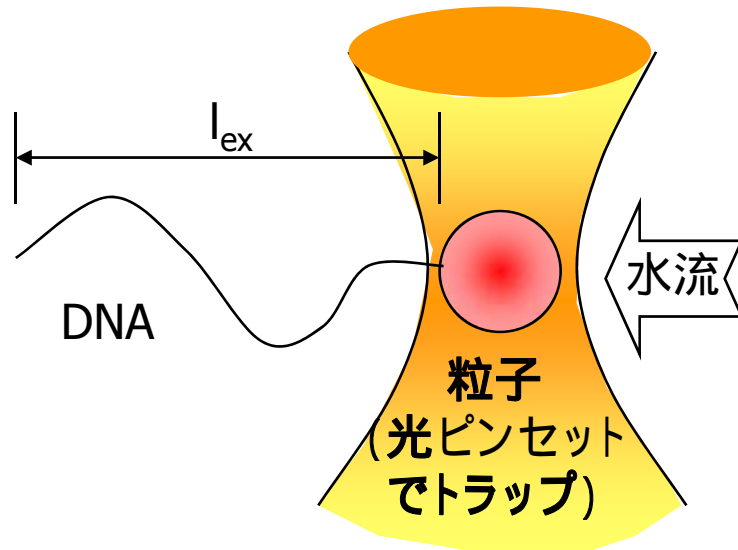
左巻き
直径: 1.8 nm

染色体



DNAの伸張

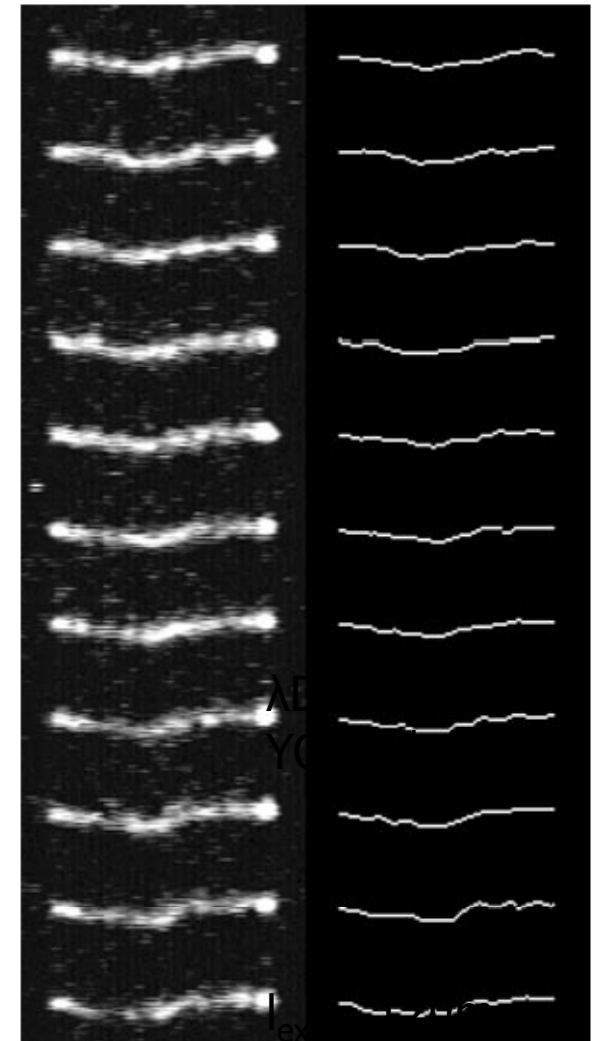
S. R. Quake, S. Chu, Nature, 388, 151 (1997).



DNA = Polymer Model

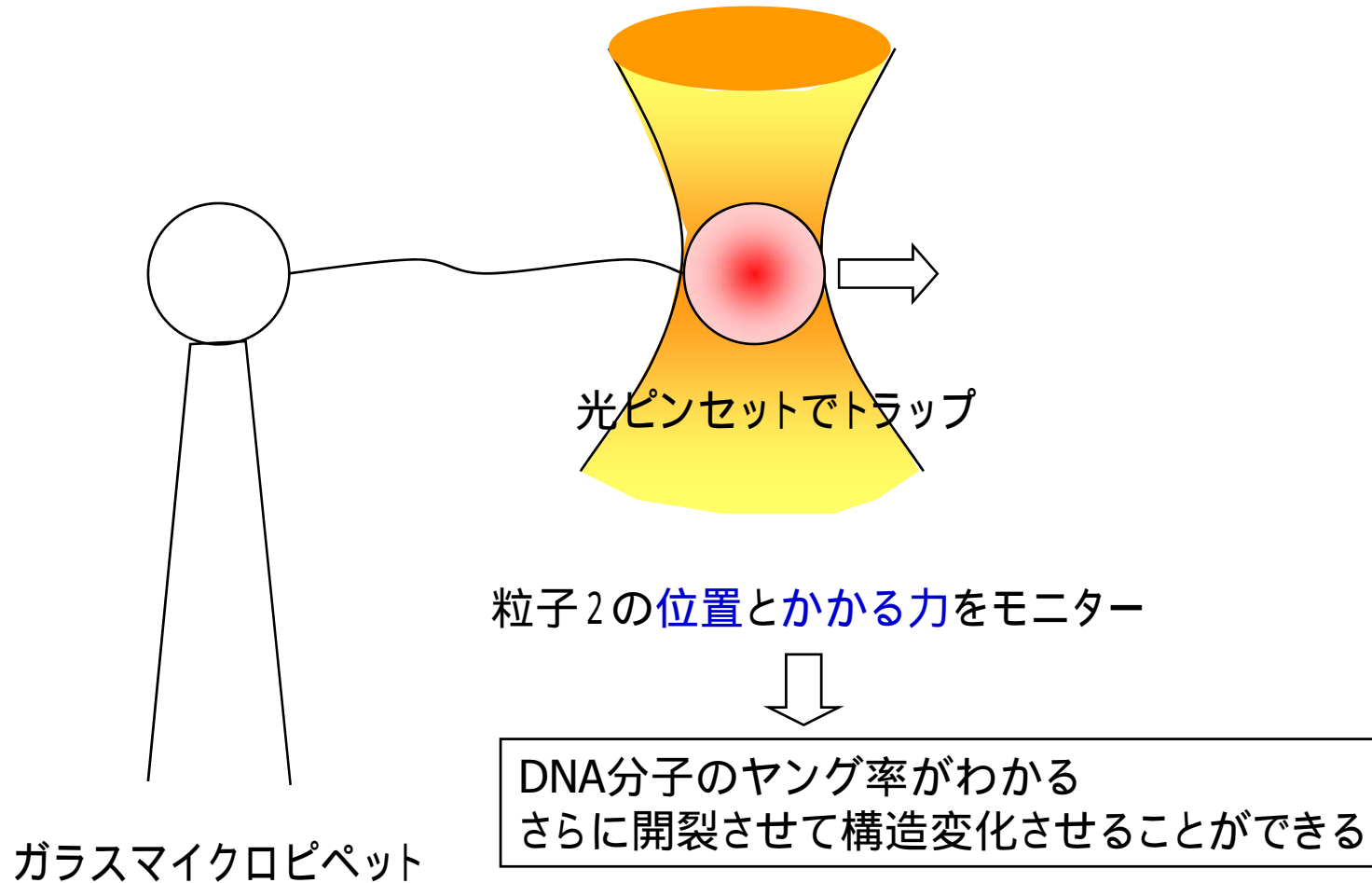
流れの中での高分子の動態を調べる

Normal-mode theory
・mode amplitude
・relaxation time



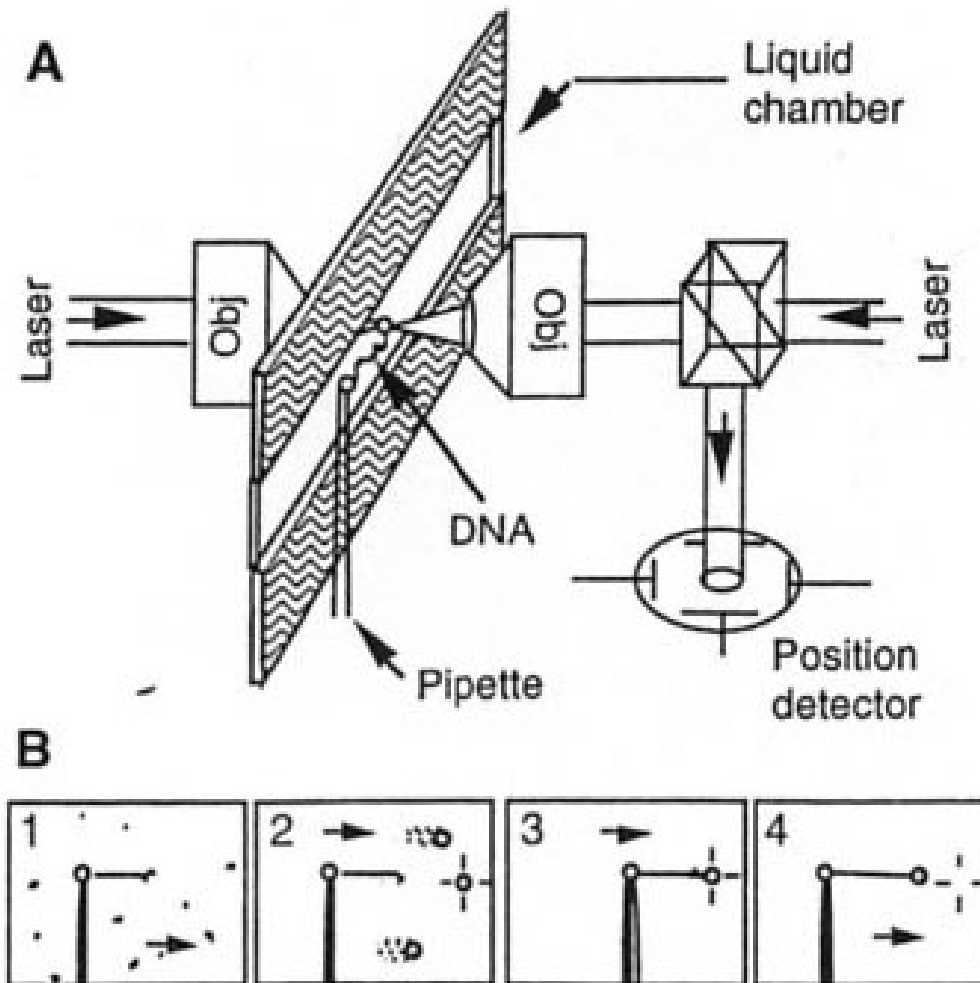
S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Science, 271, 795 (1996).

DNAの延伸



DNAの延伸

S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Science, 271, 795 (1996).



DNAの延伸に関する文献

Magnetic Force

- S. B. Smith, L. Finzi, C. Bustamante (Univ. Oregon)
Direct Mechanical Measurements of the Elasticity of Single DNA Molecules by Using Magnetic Beads,
Science, Vol. 258, 1122- 1126 (1992).
- T. R. Strick, J. F. Allemand, et.al. (Institut Pasteur)
The Elasticity of a Single Supercoiled DNA Molecule
Science, Vol. 271, 1835-1837 (1996).

Fiber Needle

- P. Cluzel, A. Lebrun, et. al. (M-P Molekulare Genetik)
DNA: An Extensible Molecule
Science, Vol. 271, 792-794 (1996).

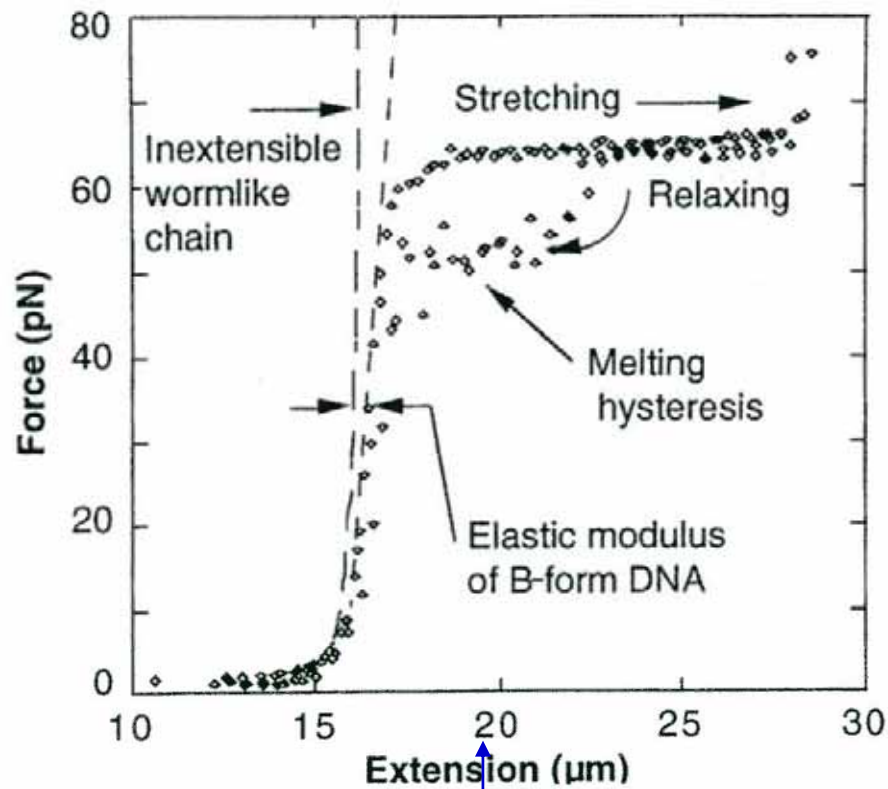
Optical Tweezers

- S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante (Univ. Oregon)
Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules
Science, Vol. 271, 795-799 (1996). ¥

DNAの延伸

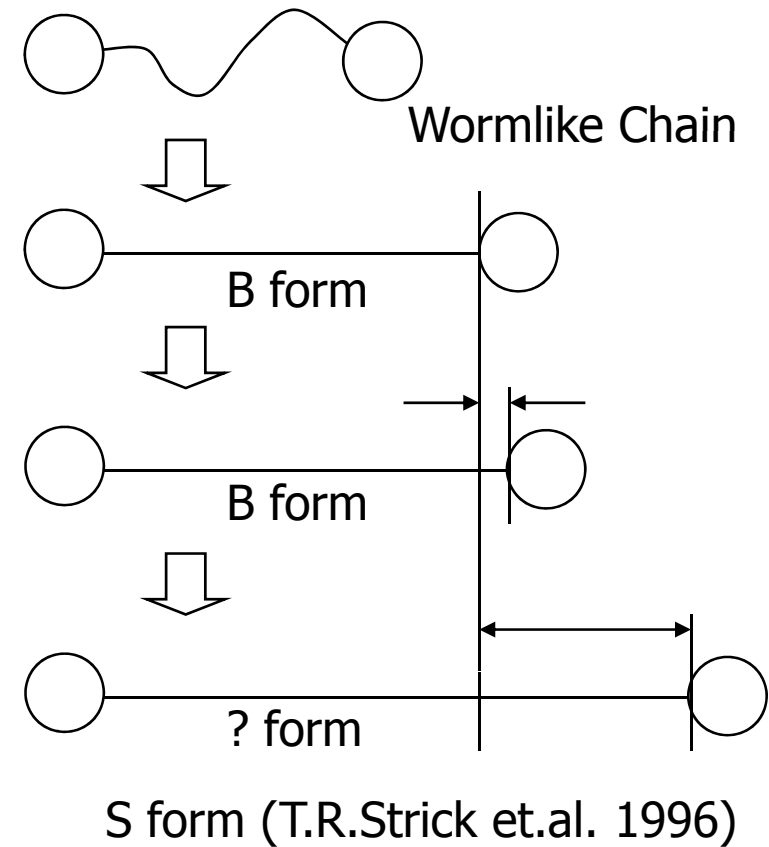
S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Science, 271, 795 (1996).

65pN



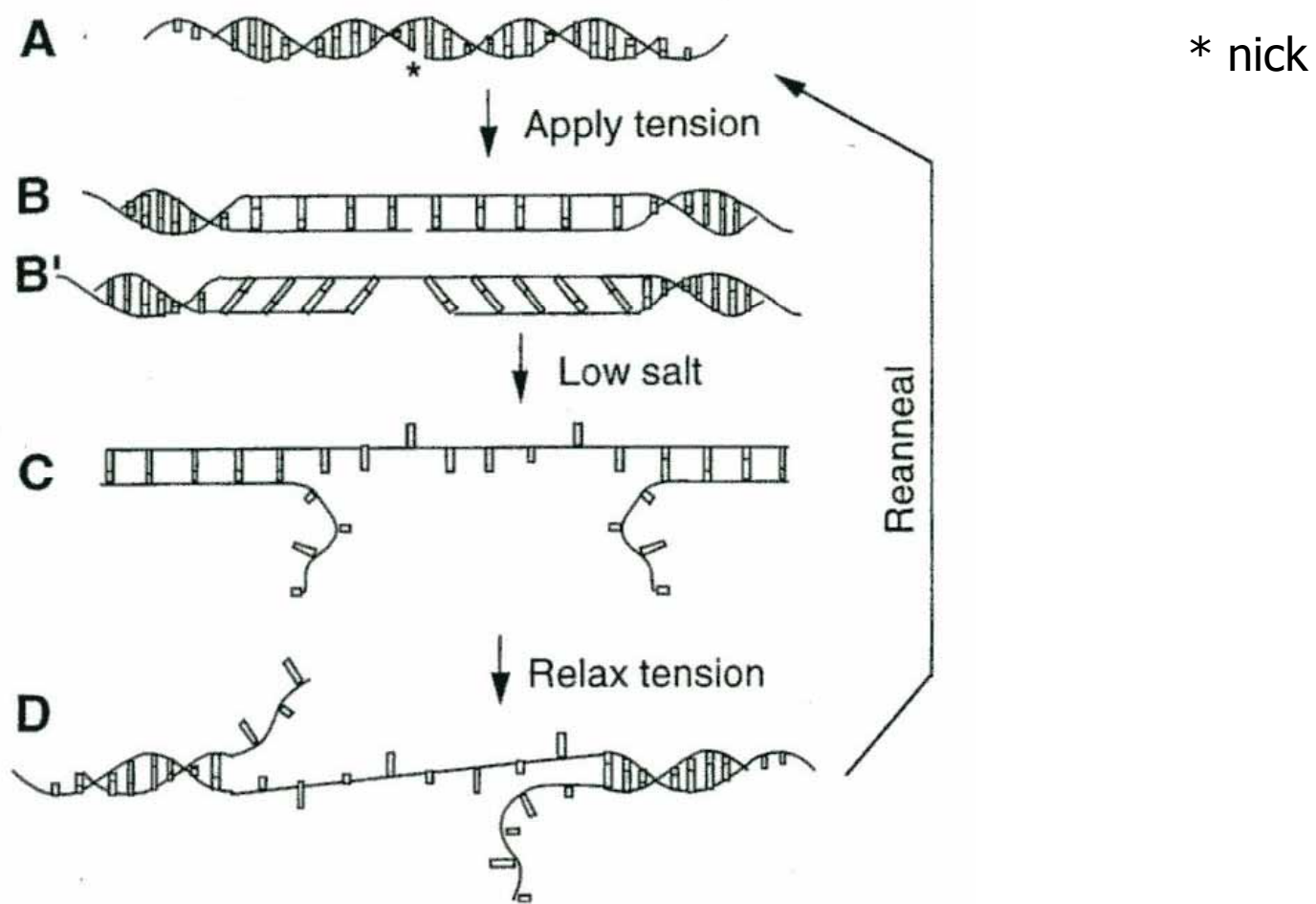
x1.0

x1.7



DNAの延伸

S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Science, 271, 795 (1996).



Pauling によるDNA構造 (1953)

A PROPOSED STRUCTURE FOR THE NUCLEIC ACIDS

BY LINUS PAULING AND ROBERT B. COREY

GATES AND CRELLIN LABORATORIES OF CHEMISTRY,* CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY

Communicated December 31, 1952

The nucleic acids, as constituents of living organisms, are comparable in importance to the proteins. There is evidence that they are involved in the processes of cell division and growth, that they participate in the transmission of hereditary characters, and that they are important constituents of viruses. An understanding of the molecular structure of the nucleic acids should be of value in the effort to understand the fundamental phenomena of life.

PNAS, Vol. 39, pp. 84-97 (1953).

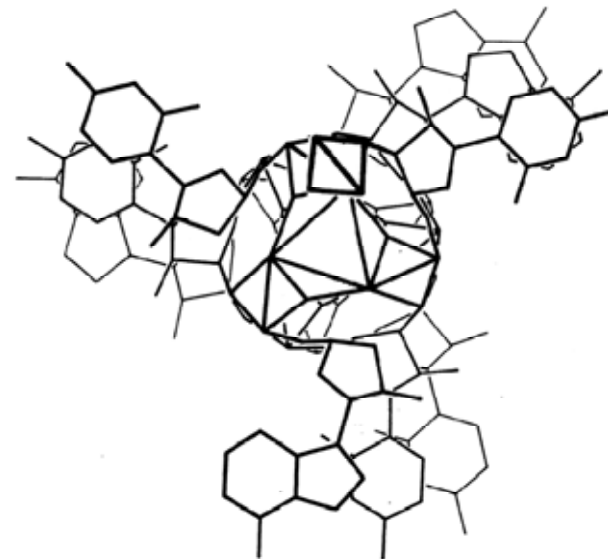
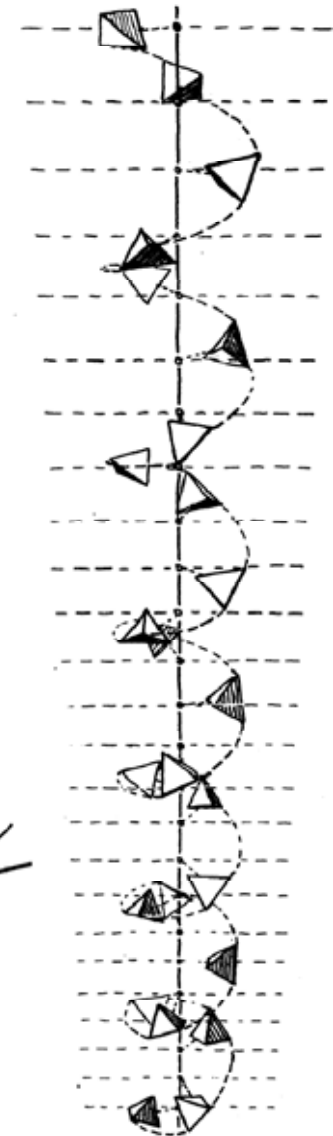
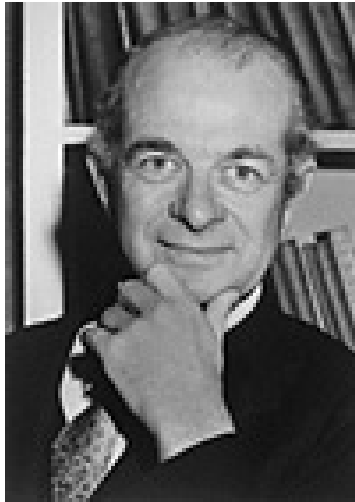


FIGURE 6



Linus Carl Pauling, 1901-1994



The Nobel Prize in Chemistry 1954

"for his research into the nature of the chemical bond and its application to the elucidation of the structure of complex substances"

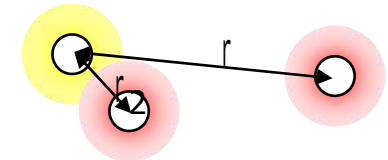
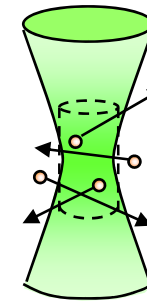
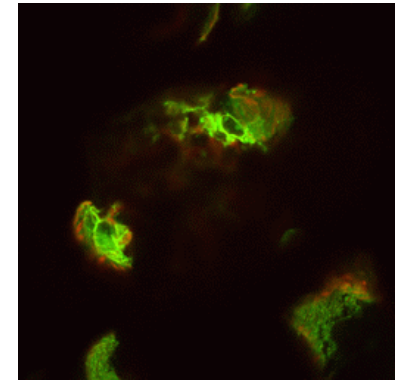
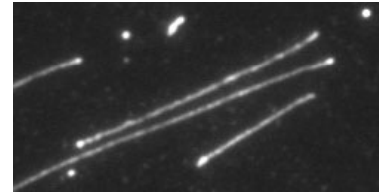


The Nobel Peace Prize 1962

先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

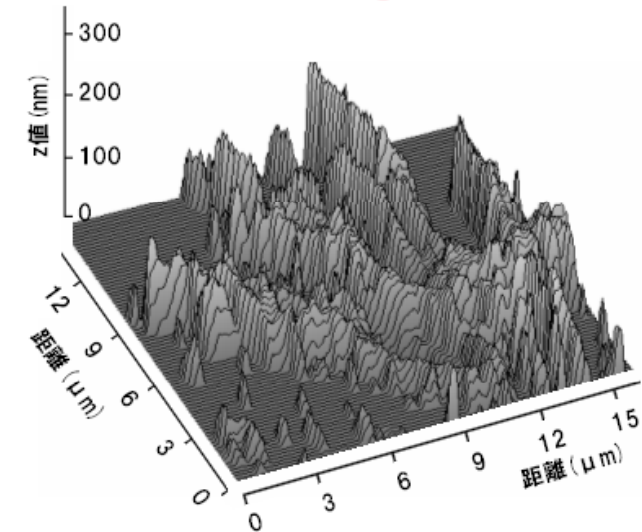
1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング
 - バイオイメージングの基礎
 - 光学顕微鏡、蛍光
 - 共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)
 - 光ピンセットの基礎



2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測
 - 分子クラッチの計測
 - 一分子DNAの力学特性計測
 - 一分子間相互作用計測

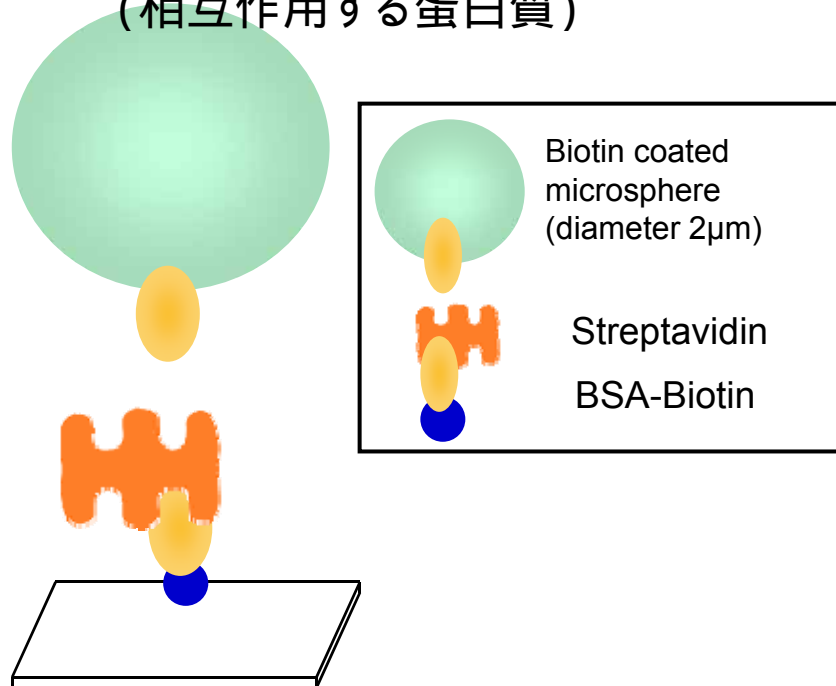


一分子力計測 –計測モデル–

- 基本は ポリスチレン粒子とガラス基板の力計測系
- クロスリンカー等を用いて、蛋白質や生体分子を粒子表面およびガラス基板上に固定 - > 計測

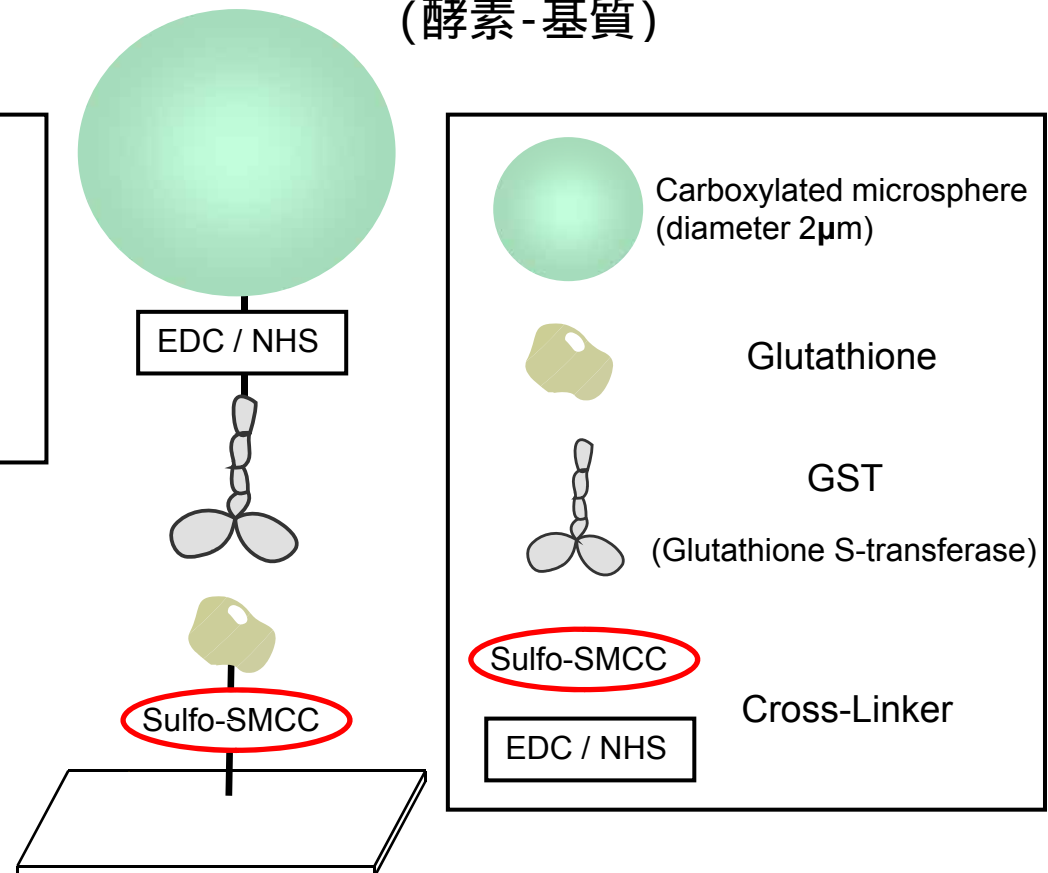
計測モデル

ストレプトアビジン - ビオチン
(相互作用する蛋白質)

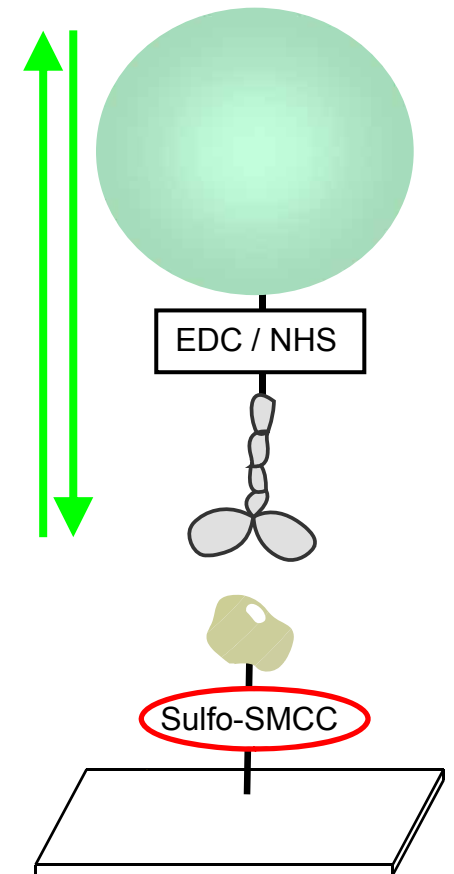
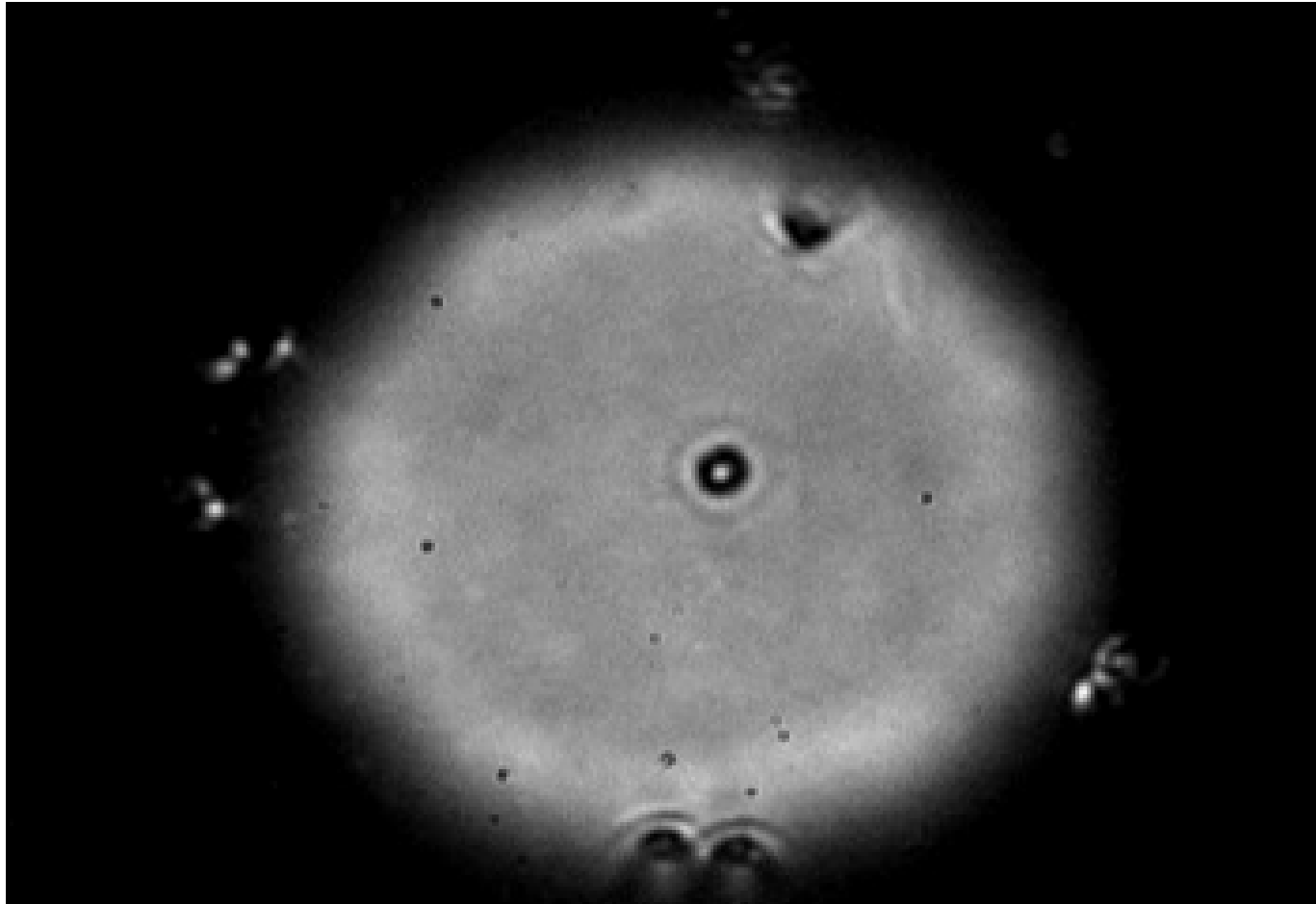


一分子蛋白質間の力場計測のために、
BSA/BSA-Biotinによる密度調節が必要

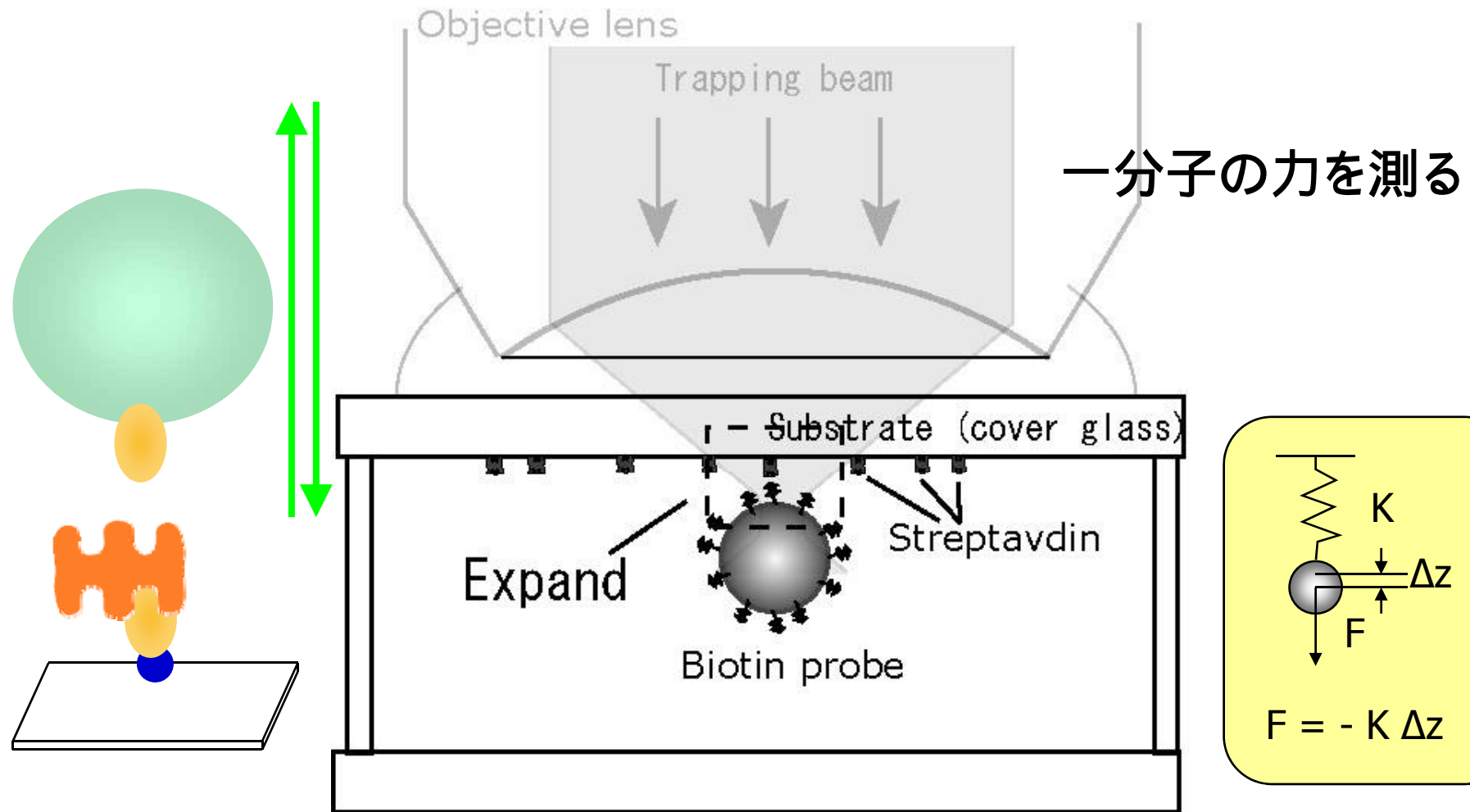
GST-グルタチオン
(酵素-基質)



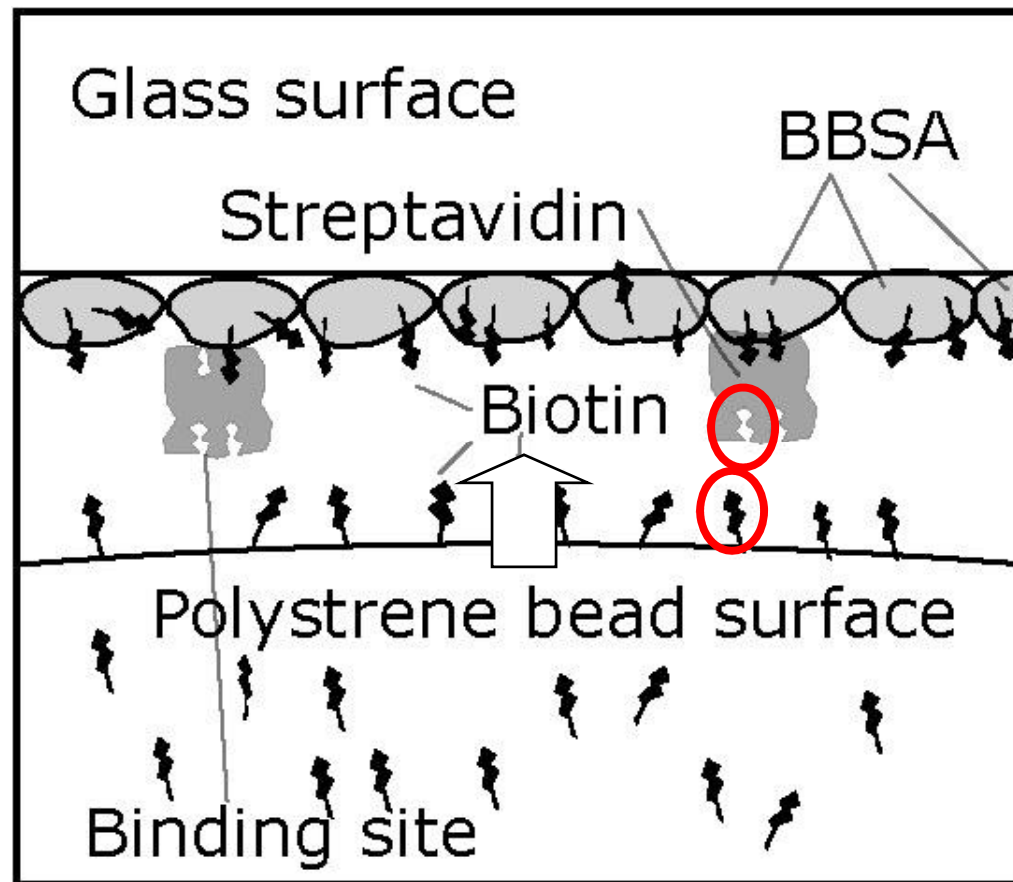
GST - グルタチオン相互作用による力発生



ストレプトアビジン-ビオチン間の結合力の計測



ストレプトアビジン-ビオチン間の結合力の計測

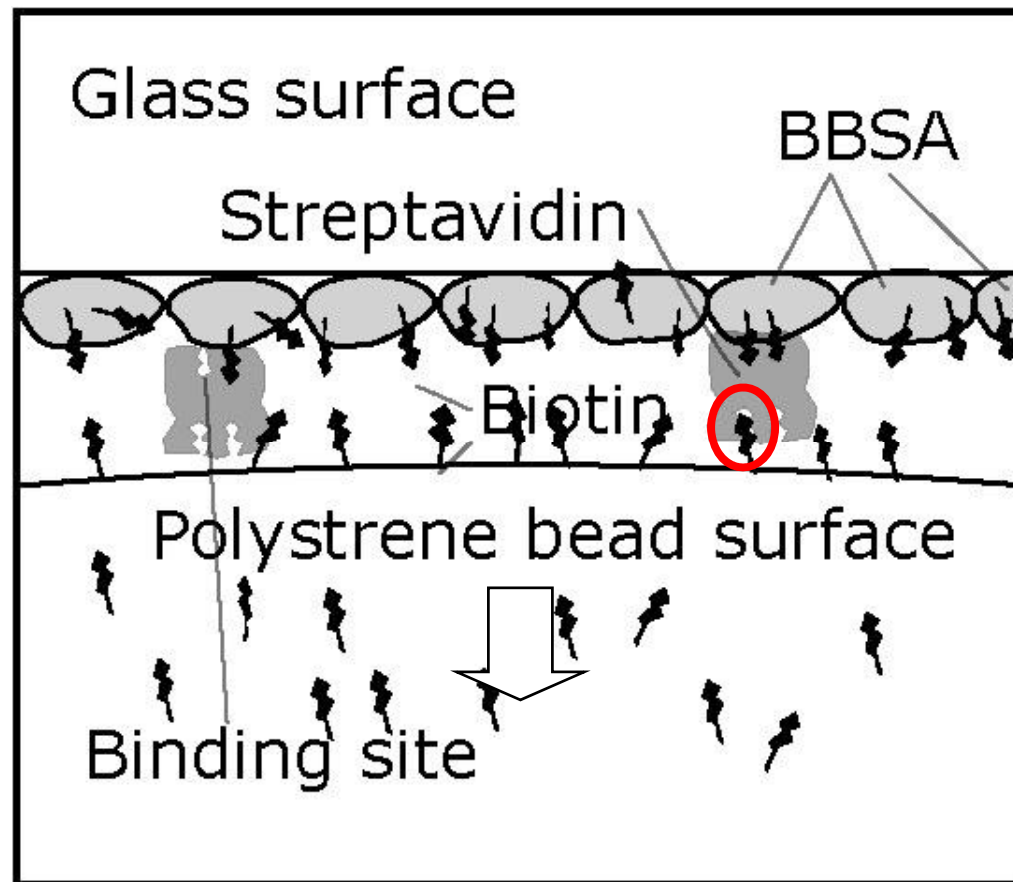


基板(ガラス)

ビオチン化BSA

粒子表面

ストレプトアビジン-ビオチン間の結合力の計測



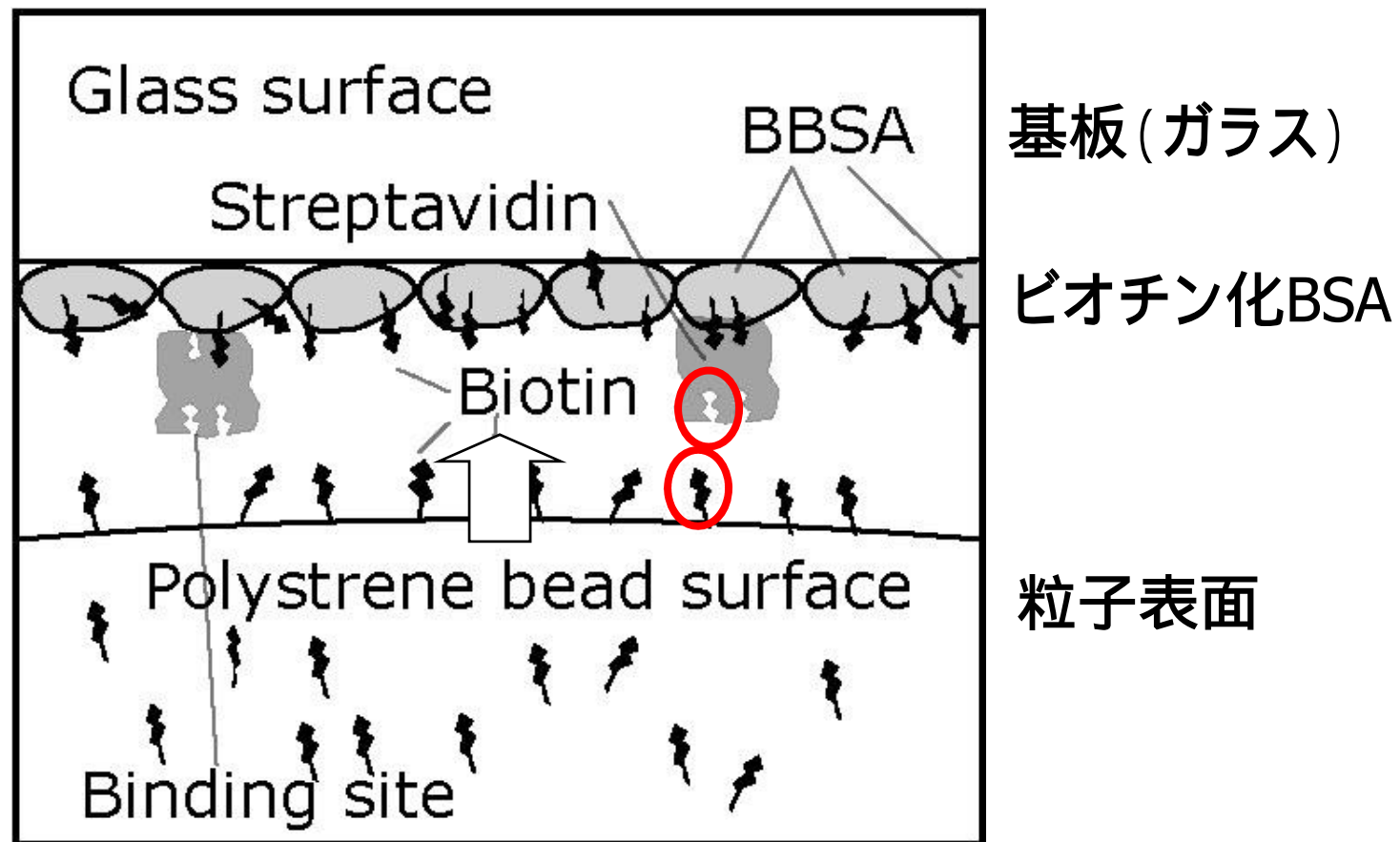
基板(ガラス)

ビオチン化BSA

$F_{\max} \sim 10\text{pN}$ 程度

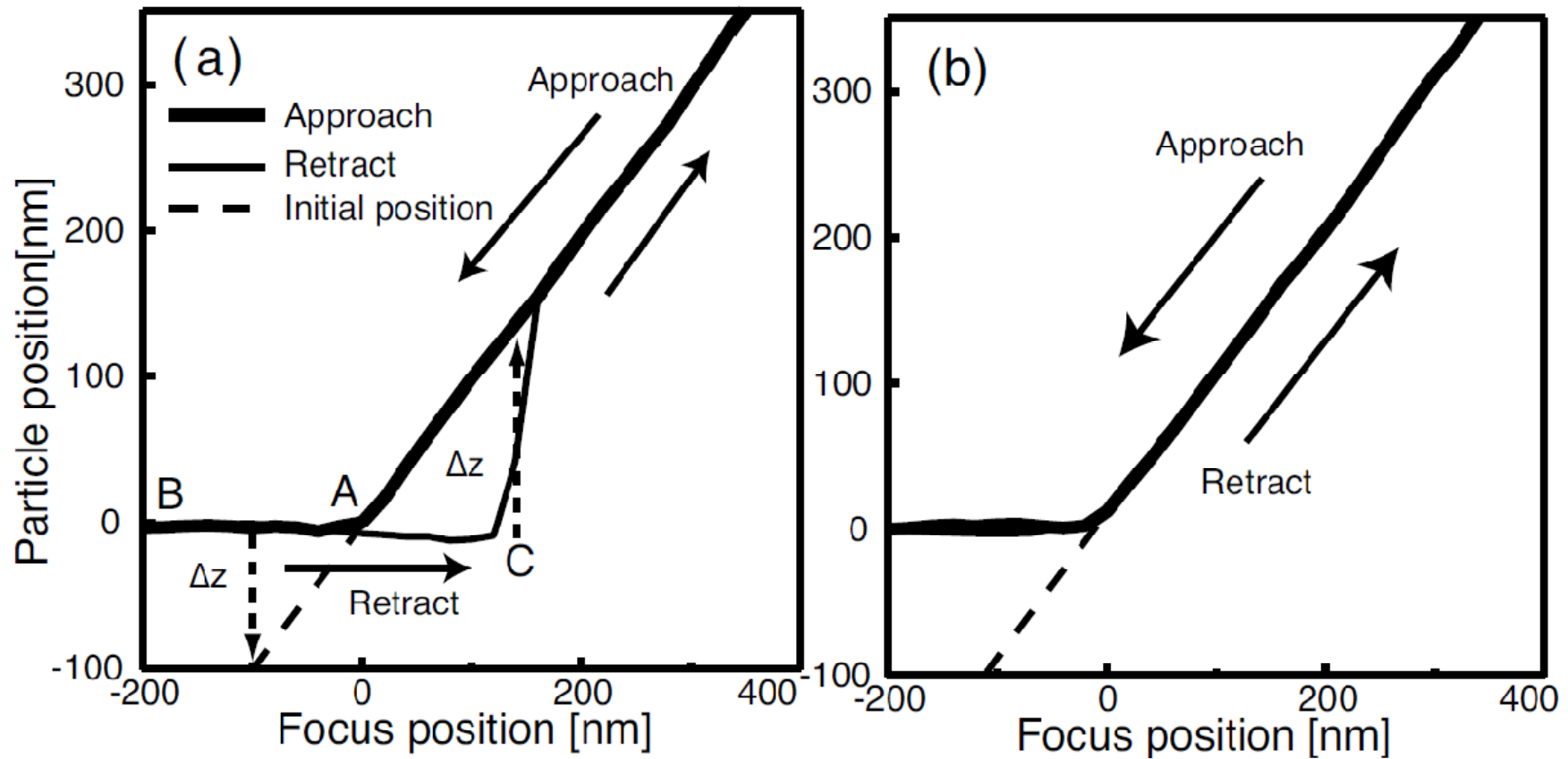
粒子表面

ストレプトアビジン-ビオチン間の結合力の計測



ストレプトアビジン-ビオチン間の結合力の計測

Approach - Retract Curve
一分子相互作用

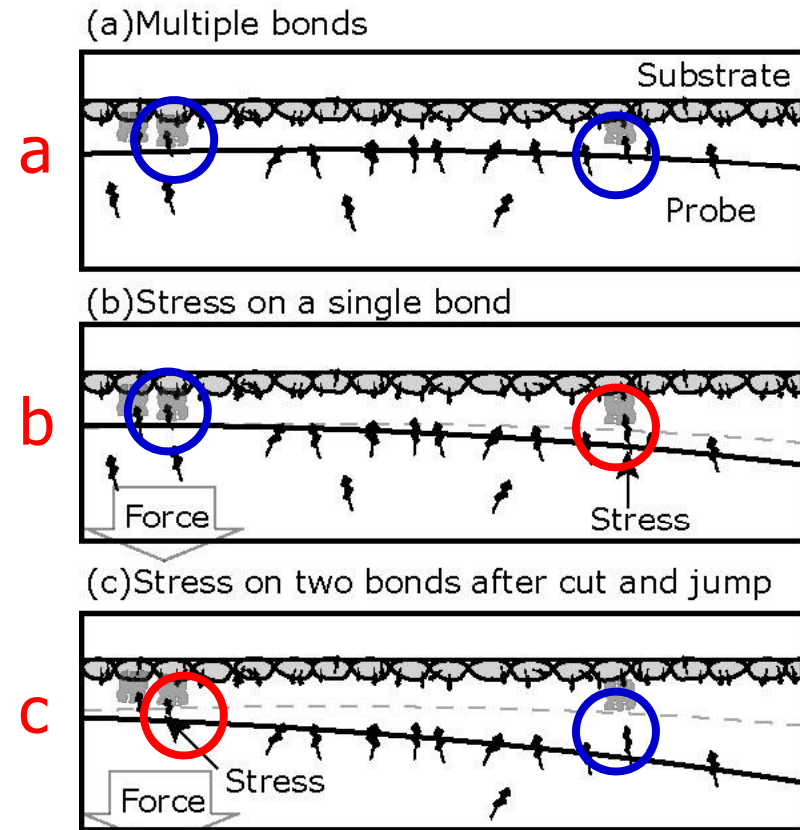
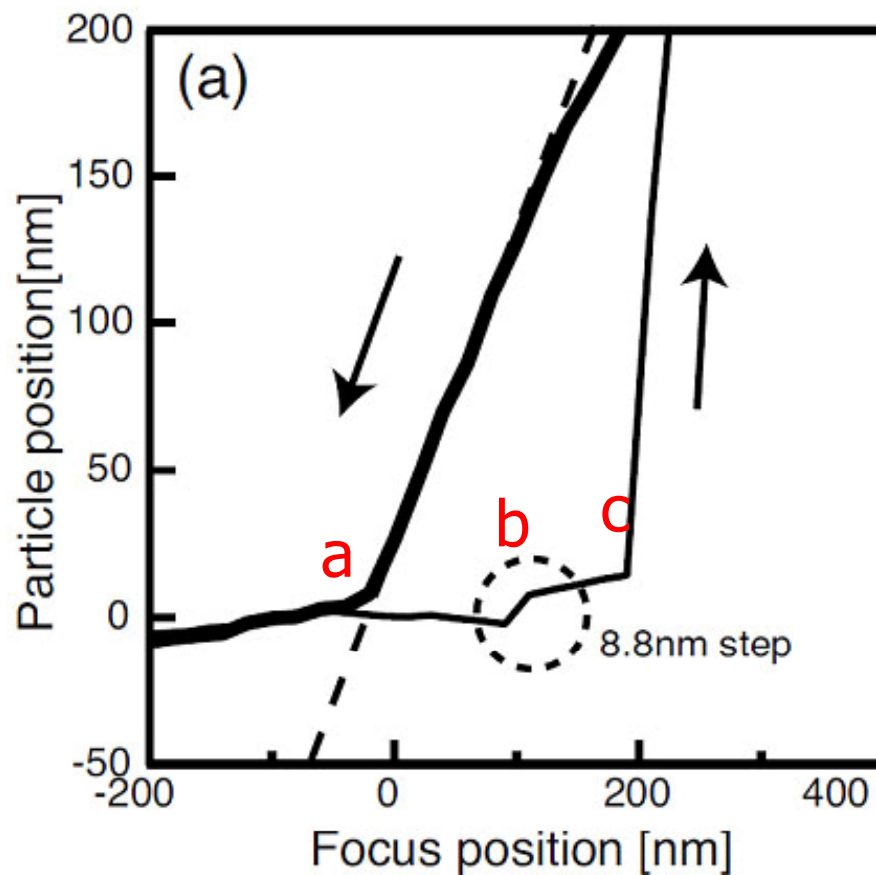


相互作用した場合

相互作用しなかった場合

ストレプトアビジン-ビオチン間の結合力の計測

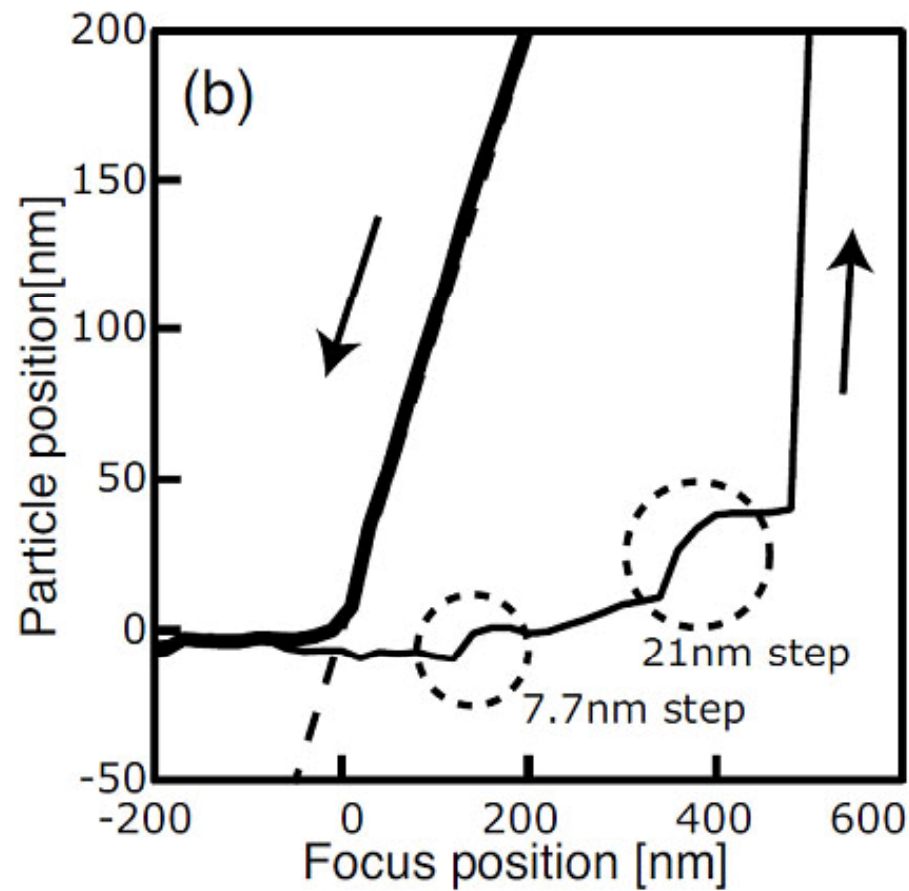
Approach - Retract Curve
複数の分子との相互作用があった場合



二分子付いていた？

ストレプトアビジン-ビオチン間の結合力の計測

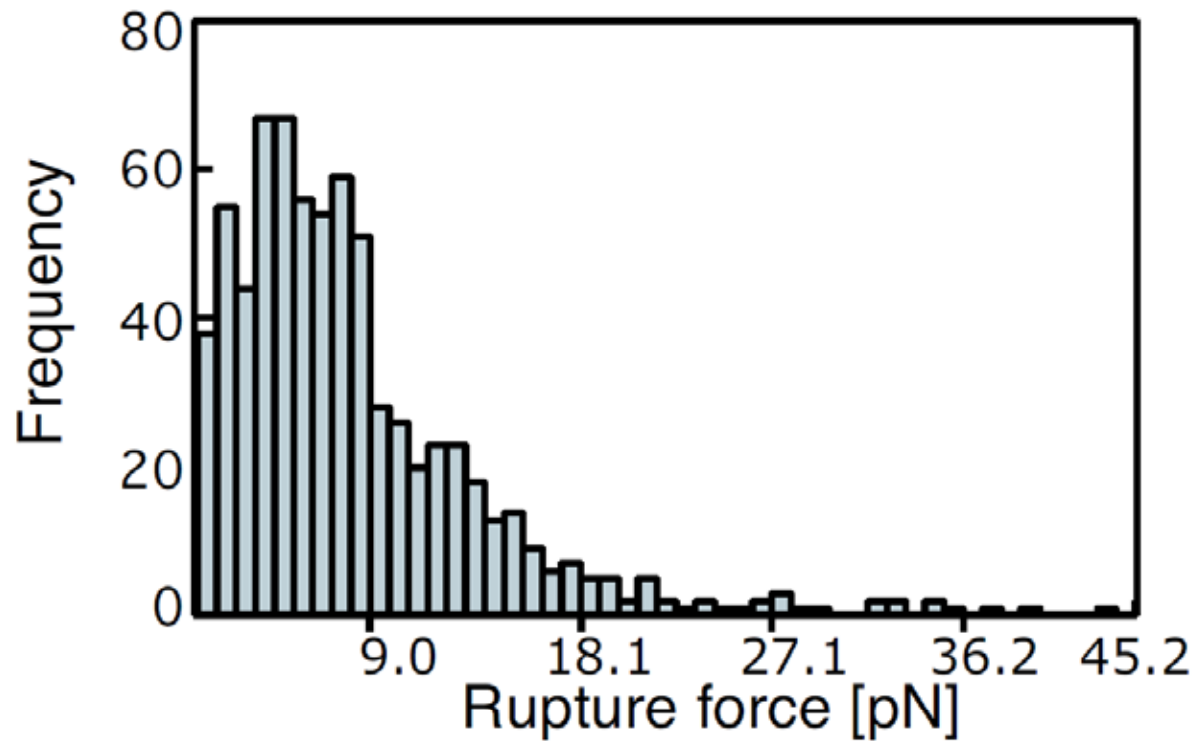
Approach - Retract Curve
複数の分子との相互作用があった場合



三分子付いていた？

ストレプトアビジン-ビオチン間の結合力の計測

引き剥がす力のヒストグラム



Loading rate: 7.7pN/s

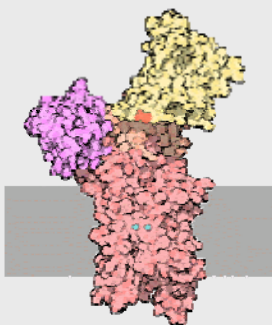
Rapture force (first): 3.6 ~ 5.6 pN

" (second): 11.8 ~ 13.6 pN

蛋白質間の相互作用における力場計測の意義

Well-known

立体構造

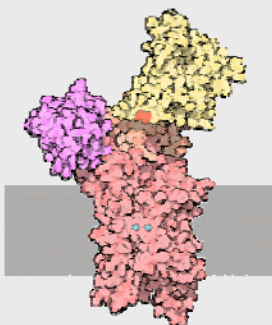


機能

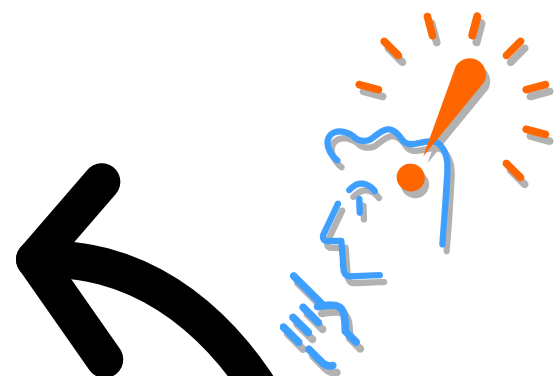
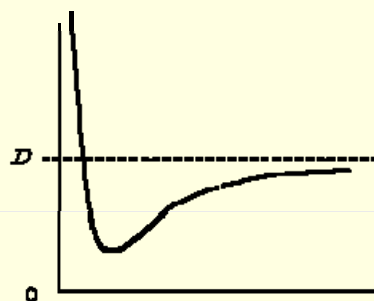


本研究

立体構造



力場



関連性を

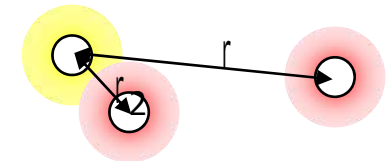
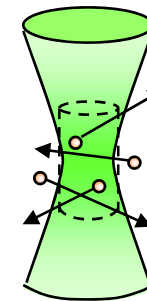
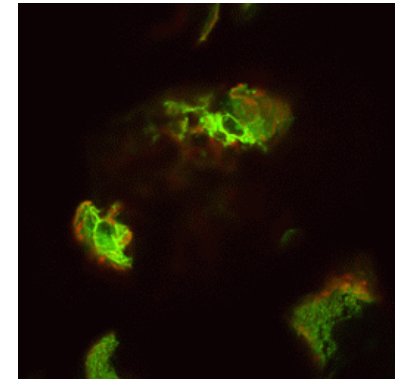
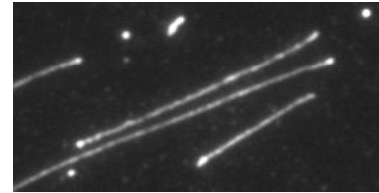
導出する

NAIST

先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

1) 先端バイオ計測 - 基礎-

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング
 - バイオイメージングの基礎
 - 光学顕微鏡、蛍光
 - 共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)
 - 光ピンセットの基礎



2) 先端バイオ計測 - 応用-

- ・ 一分子計測
 - 一分子計測の基礎
 - 一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測
 - 蛍光共鳴エネルギー移動
 - 蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測

