

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22146

研究課題名(和文)高機能オプトジェネティクスのためのマルチスケールホログラフィック光刺激技術

研究課題名(英文)Multi-scale holographic stimulation technique for higher-level optogenetics

研究代表者

的場 修(Matoba, Osamu)

神戸大学・先端融合研究環・教授

研究者番号：20282593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光照射により生きた細胞活動を制御可能なオプトジェネティクスの高性能化に向けて、ホログラフィーを用いて多数の光スポットを同時に3次元空間に形成するとともに、1 μmから20 μmの可変ビーム径を可能とし、さらに所望の領域内に配置するスポット数に関わらず一定のピーク強度を照射可能な技術を開発した。開発した技術を培養細胞に適用し、選択的制御が可能なことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命機能情報の非接触、低侵襲観察を元にした生命機能の解明や細胞活動の非接触操作により生命機能を改善するなど、生命科学における光イメージング技術及び光照明技術に対する期待は大きい。本研究の研究成果は所望の3次元位置に多数の光スポットを同時形成することを可能にし、さらに高性能な光スポット群を形成する技術を開拓したものであり、この技術を発展させることで生命科学における有用な光操作技術の確立に繋がる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed the holographic stimulation technique for achieving a higher-level optogenetics, that can control cell activity by optical irradiation. In the developed technique, multiple spots are generated in a three-dimensional space and beam spot size can be changed from 1 μm to 20 μm. Furthermore, uniform peak intensity of multiple spots can be created regardless of a number of spots. The developed technique was applied to cultured cells and selective control of cells was confirmed experimentally.

研究分野：応用光学

キーワード：ホログラフィック光刺激 オプトジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、光学技術の発達によって、細胞活動、シグナル伝達、遺伝子発現などの細胞機能を計測することが可能となってきた。さらに、光遺伝学(オプトジェネティクス)では光活性化型タンパク質を細胞に発現させ、光刺激により細胞活動を制御することが可能になっている。しかしながら、現状のオプトジェネティクスで用いられている光刺激は光ファイバによる均一な広域照明に留まり、空間的・時間的に制御性が低いものとなっている。細胞活動といっても 10 μm 程度の大きさの細胞から細胞間ネットワークの活動を観察・操作するにはこれらの複数の細胞集団をそれぞれ個別に3次元的に選択して光刺激する必要がある。その際には、刺激する細胞の数に関わらず、同じ光強度で細胞を光刺激する必要がある。

2. 研究の目的

本研究ではホログラフィック光刺激技術を細胞内・細胞間刺激に利用可能とするためにリアルタイムにスポットサイズを変更できる並列細胞光刺激技術を開発することを目的とする。ホログラフィック光刺激技術は光の波面を空間光変調素子で自在に制御し、機械的稼働部なしに3次元空間に光スポットを複数同時作成することが可能である。また、2光子吸収を用いることで、集光スポット付近のみに光刺激を行うことができるため、低散乱係数かつ低吸収係数領域の近赤外光を用いて 1 mm 深さの生体深部までを光刺激することが期待できる。

本研究では、高機能オプトジェネティクスのためのホログラフィック光刺激技術として、(1) 細胞の大きさから 1 μm から 20 μm のスポット径で 100 点以上を3次元同時刺激し、かつこの刺激パターンを 33 ミリ秒で更新可能とするマルチスケール光刺激技術の開発と、(2) 複数細胞の同時光刺激において、細胞数に関わらず光刺激強度を同じにする光パワー制御技術の2つの技術課題について取り組む。

3. 研究の方法

本研究では、様々なサイズの細胞を複数かつ同時に3次元光刺激するためのホログラフィック光スポット生成技術を構築するものである。可変スポットサイズを可能にするアプローチとして2つの方法を検討した。第1の方法はホログラムによる光スポットの設計であり、第2の方法はガルバノミラーによるビームスキャンによる方法である。

図1に2つの手法の概要を示す。ホログラムによる光スポット径を可変にする設計法の概要を図2に示す。実験では光エネルギー利用効率を考慮して、位相変調型空間光変調素子(SLM)を用いる。方法1のスポット可変法では、予め集光スポットパターンを設定し、その分布を元に、コヒーレント光波伝搬計算とフーリエ変換によりSLM面での位相分布が求まる。振幅分布を一定にするため、求められた位相分布を表示しても所望の均一な光スポットが得られない。そのため、各スポットの係数を制御する振幅係数 a_1 を導入することでスポット強度の均一化を図る。方法2のガルバノミラーを用いたビーム径拡大では、ホログラムによるマルチスポットを高速にスキャンすることで実効面積を大きくするものである。具体的にはSLM面を照明する平行平面波の入射角度を変化させることで面内のスポット位置を高速に移動させる。

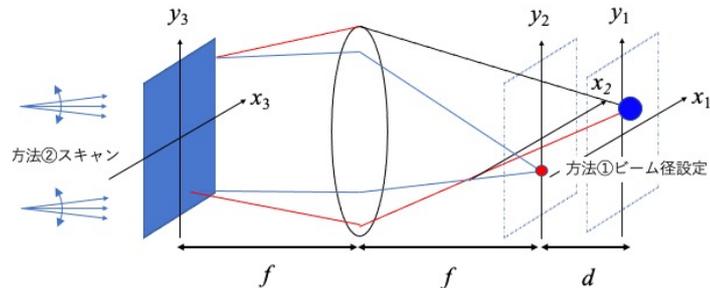


図1 マルチスポットビーム拡大手法

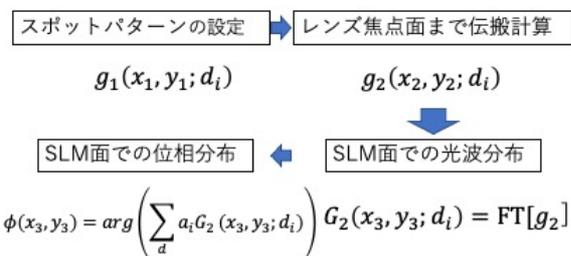


図2 マルチスポット形成のためのフィードバック型位相分布最適化手法

4. 研究成果

1光子励起及び2光子励起の2つのホログラフィック光刺激システムにおいて、スポット強度均一化、スポット数可変技術について取り組んだ結果を示す。観察領域内でのスポットのピー

ク強度を均一化するために、実験システムに光スポットの観察系を導入し、各スポットを均一化するフィードバック型の位相分布最適化設計付きホログラフィック光刺激システムを開発した(図3)。一平面で150個のスポットを形成した場合の最適化設計法の適用なしとありの場合の比較を図4に示す。光スポット形成では、5点から200点の光スポットに対して、フィードバック補正なしではスポットピーク強度のばらつきが平均値に対して約20%の標準偏差があったが、フィードバック補正により5%以下の標準偏差の分布に抑えられることを確認した(図5)。可変

焦点レンズを用いて奥行き方向にも観察可能な系を導入し、二平面での光スポットピーク強度の均一化を行った。奥行き方向に20 μm 離れた二平面で25点ずつ、合計50点のスポットを作成した場合に、8回の反復で平均値に対して54.4%から2.8%まで標準偏差を低減できることを達成した(図6)。また、光スポット数を変化させた場合でも、ピーク強度を一定にすることも必要である。そのため、領域内と領域外の2つの領域を設定し、領域内外の光スポット総数を一定として、領域内のスポット数を変化させることで領域内のスポット強度を一定化させることを試みた。その結果を図7に示す。図7では10点の光スポットを形成し、領域内に1点から10点までとしたときの平均ピーク強度を表したものである。補正することで領域内のスポット数を変化させた場合でも均一に近いピーク強度が得られている。

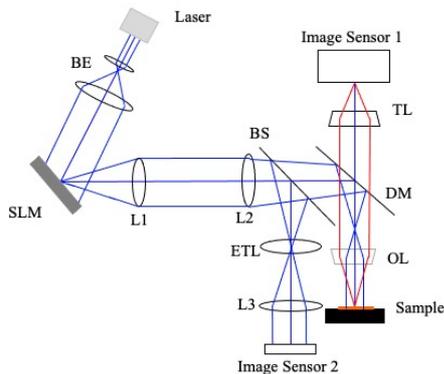
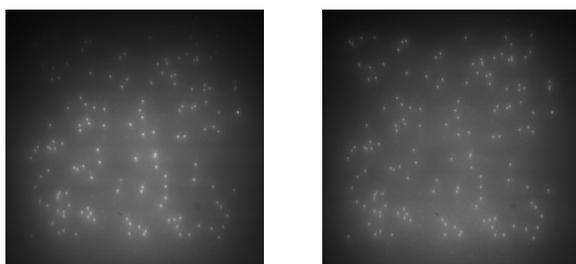


図3 フィードバック型位相分布最適化によるマルチスポット形成



(a) (b)

図4 光スポット像; (a)位相最適化なし, (b)あり

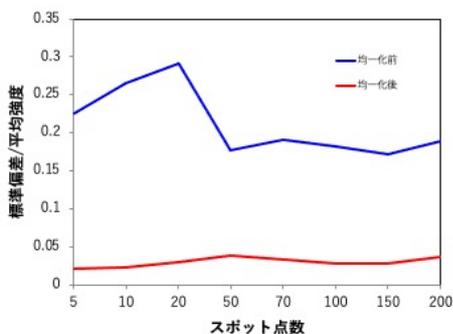
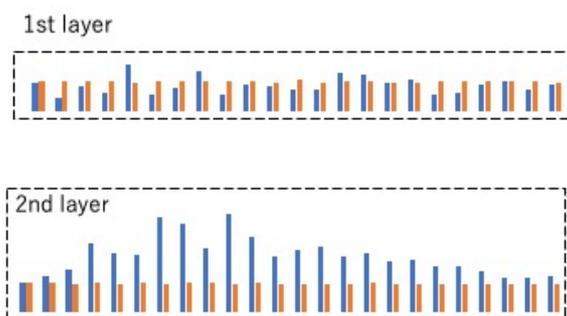
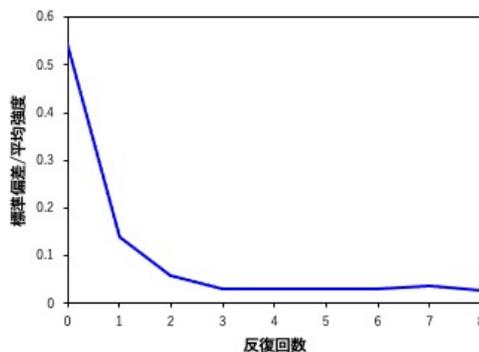


図5 スポット数に対するスポットピーク強度のばらつき



(a) (b)

図6 2層の同時スポット形成結果; (a) ピーク強度の均一化; (b)位相最適化の反復によるピーク強度ばらつきの改善結果



構築したスポット可変技術を生細胞光刺激実験に適用した。刺激光には473nmのレーザー光を用い、位相変調型空間光変調素子を用いて刺激光の形と3次元分布を制御した。スポット径を可変にする位相ホログラム設計は方法1を用いた。実験サンプルとして青色光に反応して細胞内にCaイオンを放出する培養細胞を用いた。スポット径は1 μm から50 μm まで変化させた。実験結果から全体の強度が同じ場合に、照射する面積に比例してCaイオンによる蛍光強度が増加する傾向が見られた。1光子励起では奥行き方向の選択性が弱いため、近赤外光を用いた2光子吸収現象を利用した。刺激光として波長800nm(100fs, 1kHz)のフェムト秒パルスレーザー光を用いた。レーザーパワーを100mW~150mWの間に調整したとき、1平面で20個以上の細胞を選

択的に刺激できることを確認した。

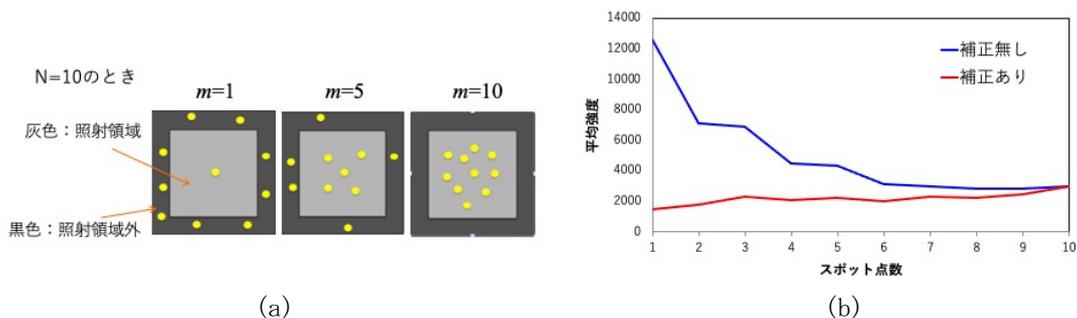


図7 スポット数可変時の各ピーク強度を一定化する手法; (a)手法の概念図, (b)スポット数可変時のピーク強度のばらつき

次に位相変調型空間光変調素子を用いて位相変調により多数の光スポットを作成し、さらに途中の経路に、レゾナント・ガルバノスキャナーを用いることで高速にスポットをスキャンさせることで、2光子励起における有効ビーム径を自在に変化させるシステムを構築した。近赤外フェムト秒レーザー光を用いて、バルクの蛍光板、蛍光ビーズ及びマウスの脳神経細胞を用いた実験により約 10 μm サイズの脳神経細胞の 2 倍程度の大きさに拡大できるのを確認した。蛍光板での 5 点のスポットの拡大前と拡大後の蛍光画像を図 8 に示す。横長に蛍光スポット像が拡大されていることがわかる。

今後の課題としては、構築した可変スポット径技術、ピーク強度均一化技術を生きた細胞操作に適用することが考えられる。次に更なる高速化に関してはガルバノミラーの動作周波数は 8 kHz 程度であり、光音響偏向素子を用いる方法が考えられる。このとき動作周波数はパルス発振の周波数に近づくため、1パルスごとに位置を操作できる可能性がある。

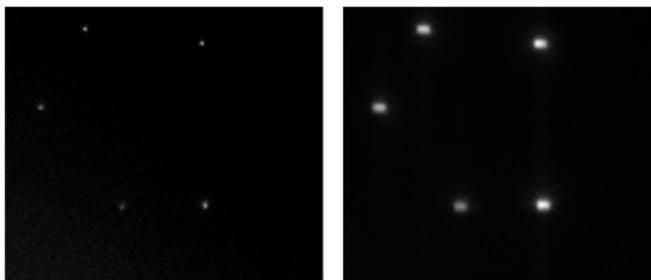


図8 ガルバノスキャナーによる多点同時ビーム径拡大実験結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okada Takuya, Kato Daisuke, Nomura Yuki, Obata Norihiko, Quan Xiangyu, Morinaga Akihito, Yano Hajime, Guo Zhongtian, Aoyama Yuki, Tachibana Yoshihisa, Moorhouse Andrew J., Matoba Osamu, Takiguchi Tetsuya, Mizobuchi Satoshi, Wake Hiroaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Pain induces stable, active microcircuits in the somatosensory cortex that provide a therapeutic target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd8261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd8261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 M. Kumar, X. Quan, Y. Awatsuji, Y. Tamada, O. Matoba
2. 発表標題 Observation of Plant Cell by Holographic 3D Illumination and Imaging Functional Optical Microscopy
3. 学会等名 OSA Digital Holography and 3-D Imaging Topical Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 O. Matoba, X. Quan, M. Kumar, Y. Awatsuji
2. 発表標題 Holographic 3D Stimulation and Observation for Neuroscience
3. 学会等名 Workshop on Information Optics 2019 (WIO2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 X. Quan, M. Kumar, O. Matoba, Y. Awatsuji, H. Wake
2. 発表標題 An Intensity Equalization Technique in SLM Generated Focus Spots
3. 学会等名 OSK-OSA-OSJ Joint Symposia in Optics and Photonics Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小管 啓仁, 全 香玉, 森田 光洋, 的場 修
2. 発表標題 生体培養細胞の三次元観察に向けたホログラフィック刺激システム
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井原 凌, 全 香玉, Manoj Kumar, 粟辻 安浩, 的場 修
2. 発表標題 細胞刺激に向けたホログラフィック 3次元マルチスポット作成システム
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Ihara, Xiangyu Quan, Yasuhiro Awatsuji, Osamu Matoba
2. 発表標題 Improvement of Holographic Multi-spot Pattern with Feedback Optimization for Cell Manipulation
3. 学会等名 International Sympoium on Imaging, Sensing, and Optical Memory (ISOM'20) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	全 香玉 (Quan Xiangyu)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	和氣 弘明 (Wake Hiroaki)		
研究協力者	森田 光洋 (Morita Mitsuhiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関