

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26560456

研究課題名(和文) 高速走査型光刺激装置の開発

研究課題名(英文) Development of a fast photo-stimulation device

研究代表者

中井 淳一 (NAKAI, Junichi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：80237198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年チャンネルロドプシン等の光感受性機能分子が応用され、神経回路の研究に大きく寄与するようになってきた。本研究ではタンタル酸ニオブ酸カリウム(KTN)結晶を使用したXYスキャナー(KTNスキャナー)を用いて高速でレーザー光をXY移動制御可能な光刺激装置の開発を行なった。二光子励起によるfluoresceinの蛍光を観察した結果、KTNスキャナーを用いた世界初の多光子光刺激装置の開発に成功した。光刺激の際の光照射位置のXY移動が従来技術であるガルバノスキャナーによる方法より10倍以上高速化された。本研究成果は光操作技術を進歩させるもので、光を利用する脳科学や自然科学の飛躍的な前進が今後期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, optogenetics is getting popular for studying neuronal circuits. In this research, we developed a photostimulation device that used a fast XY scanner with potassium tantalate niobate (KTN) crystal. World-fast two photon excitation of fluorescein could be achieved with this newly developed photostimulation device with KTN scanner. Scan speed of the KTN scanner is more than 10 times faster than that of the galvano scanner. This research will advance brain science and natural science in which optical technique is more important.

研究分野：分子神経生理学

キーワード：光遺伝学 KTNスキャナー 多光子励起 高速走査

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は GFP を用いた蛍光 Ca^{2+} センサー G-CaMP (Nakai ら *Nat Biotechnol*, 2001) や最近では赤色の蛍光 Ca^{2+} センサー R-CaMP (Ohkura ら *PLoS One*, 2012) を開発し、 Ca^{2+} イメージングにより神経活動を測定し脳機能を解明する研究を行っている。最近、チャンネルロドプシン等 (Yizhar ら *Neuron*, 2011) の光感受性機能分子が飛躍的な発展を見せ、 Ca^{2+} イメージングと組み合わせることにより脳研究のさらなる発展が期待できるようになってきた。これまで研究代表者は電気光学素子 (EO 素子) であるタンタル酸ニオブ酸カリウム (KTN) 結晶を用いた光学素子を顕微鏡に応用する研究を行ってきた。本研究ではさらに最近開発された KTN 結晶を使用した高速 XY スキャナー (KTN スキャナー) (NTT 技術ジャーナル 2009. 11, 16-19) を用いて超高速で刺激用レーザー光を XY 移動制御可能な光刺激装置の開発を行った。レーザー走査は基本となる技術であるため、走査技術の研究者からも KTN スキャナーは興味を持たれている技術である。

2. 研究の目的

本研究では最近新たに開発された KTN スキャナーを顕微鏡に応用し、超高速で光刺激用レーザーの XY 位置を制御できる顕微鏡用光刺激装置を開発する。速度は従来の共振ガルバノスキャナーの 10 倍以上を目指す。本研究は、最近開発された KTN スキャナーを世界で初めて顕微鏡用光刺激装置に応用する点で先進的、独創的で、(1)超高速 XY スキャンと(2)エネルギーロスの低減を可能にする。

本技術による光操作技術の進歩により、光を利用する脳科学や自然科学が飛躍的に前進し、また、レーザー技術は生物分野以外に医療やレーザー加工機など工業分野への応用範囲も広がることが期待される。

3. 研究の方法

装置開発： 2 光子顕微鏡用のフェムト秒赤外線パルスレーザーとして Chameleon Vision II (コヒーレントジャパン) を用い、電動シャッター (SH05, ソーラボジャパン) によりレーザーを on-off 制御した。レーザーパワー制御には Electro-optic (EO) device (Model 302A, Conoptics) を用いた。EO device を通過した光はさらにビームコンディショナー (MPM-BCU, ソーラボジャパン) を通し、その後 0.3x ビームエクspander にてビームを絞り、plano-convex lens (ソーラボジャパン) を通し、2 次元 KTN スキャナー (NTT アドバンステクノロジー) に導入した。KTN スキャナーを通った光は、さらにスキャンレンズ、チューブレレンズ、dichroic mirror (FF670-SDi01-25 x 36, セムロック) を通した後対物レンズ

(4x、または 10x、ニコン) に導入した (図 1)。

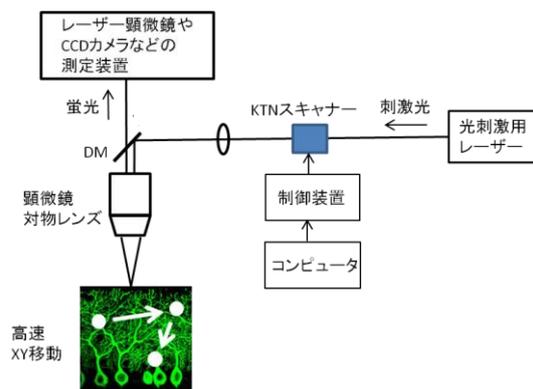


図 1 本研究開発の光刺激装置を組み込んだ光刺激・イメージング装置の模式図 (実際の光路図を簡略化して記載)

2 次元 KTN スキャナーの制御には KTN コントローラー (KST1000BAI-00, NTT アドバンステクノロジー) を使用した。また、100kHz の高速スキャンには KTN Scanner driver (KPS1001CH0-00, NTT アドバンステクノロジー) を用いた。

動作確認： 動作確認のためサンプルとして Fluorescein または Texas-red の溶液 (0.1mM) をキャピラリーに満たし観察した。観察は CCD カメラにより行った。

4. 研究成果

装置開発： 方法に記載したように光刺激装置を組み立てた (図 2, 図 3)。

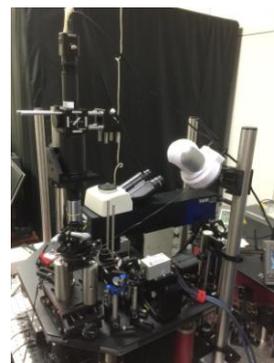


図 2 開発した光刺激装置

また、KTN スキャナーの制御に用いた KTN コントローラーを図 4 に示す。

開発した装置を用いて 10 倍対物レンズにて Texas-red の溶液を 860nm の励起光にて光刺激した (図 5)。自在に刺激できることがわかる。



図3 開発した光刺激装置 (KTN スキャナー部) の写真



図4 KTN コントローラー (写真下の装置)



図5 開発した光刺激装置により Texas-red を光刺激した。TV モニターの画面をビデオ撮影した。動画の1コマ。リサーチ図形。

また、100kHzでの走査でも KTN スキャナーは動作し、蛍光シグナルを観察することができた。

ところでレーザー波長を 800nm から 900nm に変更したところ、ビームの偏光角がやや減少した。これは予想されたことであるが、KTN スキャナーの偏光角は波長依存性がある。

考察

本研究では、2次元高速スキャナーである KTN スキャナーを用いて顕微鏡用光刺激装置を開発した。KTN スキャナーを用いハイパワー近赤外フェムト秒パルスレーザー光を高速 (100kHz) に2次元走査することに成功した。さらに KTN スキャナーにより

走査された近赤外パルスレーザー光を用いて、蛍光物質を2光子励起し、そこから発せられた蛍光を CCD カメラにて撮影することに世界で初めて成功した。KTN スキャナーは EO 現象を動作原理として用いたスキャナーであるため、従来の機械的なスキャナー (ガルバノスキャナー等) よりも 10~100 倍以上高速に動作する利点がある。また、KTN スキャナーには可動部分が無いため振動等が発生することもない。さらに、KTN スキャナーに用いられている KTN 結晶は透過性が高いためレーザーパワーロスを低く抑えることが可能である。通常のレーザーや LED による光励起では、1光子による光励起であるため、光路上の蛍光物質も励起されてしまう欠点があるが、本研究で開発した光刺激装置はフェムト秒赤外線パルスレーザーによる多光子励起現象を用いているため、焦点位置のみが光励起され、その他の部位は光励起されない。よって、通常のレーザーや LED よりもより正確に光刺激できる利点がある。

レーザー波長と偏光角について、本 KTN スキャナーは動作原理において光の屈折を電圧により制御することにより機能する。したがって、励起光の波長が変わると偏光角も変わるのとは予想されたことである。これは事前に波長と偏光角を調べておくことにより波長を変更した際、印加する電圧を調節することにより補正可能である。

本研究で開発した光刺激装置は、光遺伝学等の光操作技術が今後ますます有効な研究手段となると予想される脳科学や自然科学の研究で利用されるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7件)

①Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamiyo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H, Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2, Nat Methods, 査読有、12、2015、64-70
DOI : 10.1038/nmeth.3185

②Ogino K, Low SE, Yamada K, Saint-Amant L, Zhou W, Muto A, Asakawa K, Nakai J, Kawakami K, Kuwada JY, Hirata H, RING finger protein 121 facilitates the degradation and membrane localization of voltage-gated sodium channels, Proc Natl Acad Sci USA, 査読有、112、2015、2859-2864
DOI : 10.1073/pnas.1414002112

③Shimizu H, Schredelseker J, Huang J, Lu K, Naghdi S, Lu F, Franklin S, Fiji HD, Wang

K, Zhu H, Tian C, Lin B, Nakano H, Ehrlich A, Nakai J, Stieg AZ, Gimzewski JK, Nakano A, Goldhaber JL, Vondriska TM, Hajnóczky G, Kwon O, Chen JN, Mitochondrial Ca²⁺ uptake by the voltage-dependent anion channel 2 regulates cardiac rhythmicity, *Elife*, 査読有、4、2015、1-20
DOI : 10.7554/eLife.04801

④Sato T, Ishikawa M, Mochizuki M, Ohta M, Ohkura M, Nakai J, Takamatsu N, Yoshioka K, JSAP1/JIP3 and JLP regulate kinesin-1-dependent axonal transport to prevent neuronal degeneration, *Cell Death Differ*, 査読有、2015、Jan 9
DOI : 10.1038/cdd.2014.207

⑤ Shintani Y, Drexler HC, Kioka H, Terracciano CM, Coppen SR, Imamura H, Akao M, Nakai J, Wheeler AP, Higo S, Nakayama H, Takashima S, Yashiro K, Suzuki K, Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2, *EMBO Rep*, 査読有、15、2014、438-445
DOI : 10.1002/embr.201337945

⑥Yasui H, Lee JK, Yoshida A, Yokoyama T, Nakanishi H, Miwa K, Naito AT, Oka T, Akazawa H, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I, Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix, *Biomaterials*, 査読有、35、2014、7839-7850
DOI : 10.1016/j.biomaterials.2014.05.080

⑦Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M, Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single neuron operant conditioning, *Nat Commun*, 査読有、24、2014、5551
DOI : 10.1038/ncomms6551

[学会発表] (計 15件)

①Tanaka M, Shih P-Y, Gomi H, Yoshida T, Nakai J, Ando R, Furuichi T, Mikoshiba K, Samyanov A, Itohara S, A new transgenic mouse model revealed a role of astrocytic calcium in vivo, 第88回日本薬理学会年会、2015年03月18日~2015年03月20日、名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市)

②井上昌俊、竹内敦也、堀金慎一郎、大倉正道、安藤恵子、藤井哉、上條諭志、竹本一木村さやか、狩野方伸、中井淳一、喜多村和郎、尾藤晴彦、Rational design of a

high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2、第88回日本薬理学会年会、2015年03月18日~2015年03月20日、名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市)

③Tanimoto Y, Yamazoe A, Fujita K, Kawazoe Y, Miyanishi Y, Yamazaki SJ, Gengyo-Ando K, Nakai J, Fei X, Iwasaki Y, Hashimoto K, Kimura K, Neuronal mechanisms of decision making in *C. elegans* olfactory behavior revealed by a highly integrated microscope system, 第34回日本神経科学学会大会、2014年11月09日~2014年11月13日、パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

④Hira R, Ohkubo F, Mazamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M, Single-neuron operant conditioning by two-photon imaging induces reward-timing-dependent modulation in cortical microcircuit, 第34回日本神経科学学会大会、2014年11月09日~2014年11月13日、パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

⑤Manita S, Suzuki T, Homma C, Matsumoto T, Odagawa M, Yamada K, Ota K, Matsubara C, Inutsuka A, Sato M, Ohkura M, Yamanaka A, Yanagawa Y, Nakai J, Hayashi Y, Larkum ME, Murayama M, The top-down circuit for sensory perception in the cerebral cortex of the mouse, 第34回日本神経科学学会大会、2014年11月09日~2014年11月13日、パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

⑥Kakinuma H, Aoki R, Aoki T, Yamazaki M, Shiraki T, Takahoko M, Eizumi K, Koide T, Yoshihara Y, Nakai J, Kawakami K, Okamoto H, Imaging of the neural circuit activities during retrieval of behavioral program for active avoidance in zebrafish, 第34回日本神経科学学会大会、2014年11月09日~2014年11月13日、パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

⑦Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Itohara S, Nakai J, Hirase H, Visualization of cerebral cortical calcium dynamics by a transgenic mouse that express G-CaMP7 in neurons and glia, 第34回日本神経科学学会大会、2014年11月09日~2014年11月13日、パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

⑧Sato T, Ohkura M, Nakai J, Takamatsu N, Yoshioka K, JSAP1 and JLP regulate kinesin-1-dependent axonal transport to prevent neuronal degeneration, 第34回日本神経科学学会大会、2014年11月09日~2014年11月13日、パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

⑨藤泰一、高橋尚也、安藤恵子、大倉正道、中井淳一、西垣功一、個体(線虫) レベルでの超多並列刺激応答モニターシステム、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日～2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

⑩民山浩輔、清水正宏、宮坂恒太、小椋利彦、中井淳一、大倉正道、細田耕、細胞触覚センサのための小型蛍光観察システムの開発、第32回日本ロボット学会学術講演会、2014年09月04日～2014年09月06日、九州産業大学(福岡県、福岡市)

⑪坂口愛沙、佐藤美由紀、安藤恵子、佐藤克哉、中井淳一、佐藤健、低分子量GTPase RAB-11の新規結合因子 REI-1/REI-2 は受精後のRAB-11再局在化を制御する、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日～2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

⑫堀江健生、大倉正道、日下部岳広、中井淳一、中川将司、ホヤ幼生の遊泳運動神経回路の構造と生理機能の解析、日本動物学会第85回大会、2014年09月11日～2014年09月13日、東北大学(宮城県、仙台市)

⑬中井淳一、大倉正道、安藤恵子、蛍光カルシウムプローブ G-CaMP による in vivo カルシウムイメージング、第58回日本薬学会関東支部大会、2014年10月04日～2014年10月04日、昭和薬科大学(東京都、町田市)

⑭Carta S, Liu W, Sych Y, Voigt FF, Chen JL, Schneider B, Ohkura M, Nakai J, Helmchen F、Imaging Deep-Layer Neuronal Activity in Mouse Barrel Cortex using 1040-nm Excitation of a Red Fluorescent Protein Calcium Indicator、Neuroscience 2014、2014年11月15日～2014年11月19日、Washington, DC, USA

⑮Podor B, Zhao Y, Wu J, Hu Y-L, Ohkura M, Nakai J, Campbell R, Croll R, Fine A、A comparative study of the two-photon performances of GCaMPs and GECOs、Neuroscience 2014、2014年11月15日～2014年11月19日 Washington, DC, USA

[図書] (計 1件)

①Takata N, Shinohara Y, Ohkura M, Mishima T, Nakai J, Hirase H、Imaging of astrocytic activity in living rodents、In: Optical Imaging of Neocortical Dynamics、Neuromethods、vol. 85、eds. Weber B, Helmchen F、New York: Springer Science Business Media、2014、chapter 12、191-207

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: カルシウム指示遺伝子
発明者: 尾藤晴彦, 井上昌俊, 竹内敦也, 中井淳一, 大倉正道
権利者: 科学技術振興機構
種類: 特許出願
番号: 特願 2014-120828
出願年月日: 2014年06月11日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等
埼玉大学脳末梢科学研究センター
<http://subs1.saitama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 淳一 (NAKAI, Junichi)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号: 80237198

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

安藤 恵子 (GENGYO-ANDO, Keiko)
埼玉大学・理工学研究科・特任教授
研究者番号: 40221741