

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 12日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24650214

研究課題名（和文）次世代光刺激装置の開発

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

研究代表者

中井 淳一（NAKAI JUNICHI）

埼玉大学・脳科学融合研究センター・教授

研究者番号：80237198

研究成果の概要（和文）：本研究は、光感受性機能分子を励起するための光刺激装置の開発に関する研究である。高速焦点移動にタンタル酸ニオブ酸カリウム(KTN)結晶を使用した結果、～23マイクロ秒で焦点移動した。本研究で開発した光刺激装置の焦点調節速度は現在主流の圧電素子を使用した技術より500～1000倍程度高速化した。本技術開発により光操作技術が飛躍的に進歩し、それを利用する脳科学を含む自然科学、および工業分野で大きな前進が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study we developed a microscope equipment with which photosensitive molecules can be stimulated. In the equipment a pair of potassium tantalate niobate (KTN) crystals were used as a tunable lens, an electro-optic device that changes its refractive index by voltage. By changing the voltage which applied to the tunable KTN lens focus changed within ~23 microseconds. The speed of focus change was about 500~1000 times faster than that of the conventional piezo focuser. This technique can be applicable not only to scientific researches including neuroscience but also industrial field such as laser processing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：光遺伝学、オプトジェネティクス、第二高調波、極超短赤外線パルスレーザー、KTN結晶

1. 研究開始当初の背景

我々は GFP を用いた蛍光カルシウムセンサー G-CaMP (Nakai ら, Nat Biotechnol, 2001) を開発し、カルシウム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。近年、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、カルシウム

イメージングと組み合わせることにより神経回路機能の研究のさらなる発展が期待できるようになってきた。

我々は細胞単位またはシナプスレベルでの局所の光活性化を目指しているが、こうした局所への光照射法にはレーザーのピンポイント照射、Digital Mirror Device (DMD) や Liquid Crystal On Silicon (L-COS) を用い

た多点照射などがある。細胞やシナプスなどのターゲットは 3 次元的に分布している事が多いので、理想的には 3 次元空間の複数のポイントに瞬時に自由にレーザー照射が行えることであるが、現実にはこれは困難なことである。つまり、上記の局所照射法はほぼすべて焦点方向 (Z 方向) の調整が必要で、現在主流となっている圧電 (ピエゾ) 素子による対物レンズの機械的な移動ではミリ秒～数十ミリ秒オーダーの時間がかかり、振動も発生してしまう。

我々は高速で顕微鏡の焦点を移動する手法を研究し、タンタル酸ニオブ酸カリウム (KTN) 結晶を用いた可変焦点レンズ (NTT 技術ジャーナル 2009. 11) を用いる方法を考案した (特許出願中)。KTN 結晶レンズは電気光学 (EO) デバイスであり、高速動作が可能である。本研究では KTN 結晶レンズを用いて、超高速焦点移動が可能な光刺激装置の試作を行う。

2. 研究の目的

KTN 結晶レンズを用い可視光レーザーを超高速で焦点調節できる顕微鏡用光刺激装置を開発する。

KTN 結晶レンズは、電氣的に超高速で屈折率を変えられる利点があるが、欠点もある。その 1 つが波長の長い光 (~700nm 以上) しか現状では安定に利用できない点である。我々は最近、KTN 結晶レンズを用いて紫外線～可視光でも超高速焦点移動を可能にする新たな方法を考案した。本研究ではこのアイデアをもとに、光刺激装置の試作を行い、可視光での超高速焦点移動を可能にする装置の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究は 1 年の計画で、(1) 装置の製作、(2) 顕微鏡への取り付け、(3) 装置のテスト・調整の 3 つの部分からなっている。

(1) 装置の製作

レーザー光源としてチタンサファイアによる極超短赤外線パルスレーザー Chameleon vision II (コヒーレントジャパン) を用いた。赤外線を可視光に変換するために非線形光学現象を利用し、バリウムボレート (BBO) 結晶および周期分極反転させたチタン酸リン酸カリウム (ppKTP) 結晶を用いて第二高調波発生 (Second Harmonic Generation SHG) の原理で可視光を発生させた (図 1)。装置のブロック図および、模式図を図 2, 3 に示す。

(2) 顕微鏡への取り付け

(1) の装置は光学除振台に配置するとともに、(1) の装置から発生させた 512nm のレーザー光を、ビームエキスパンダーおよび

レーザーミラーにより顕微鏡に導入した。

(3) 装置のテスト・調整

ビームエキスパンダーおよびレーザーミラーの位置を調整した。また非線形光学結晶の位置および焦点位置を調整した。KTN 結晶レンズには 0V~1000V までの電圧を加えて焦点調節を行った。

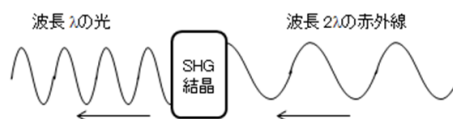


図 1 SHG 結晶による波長変換

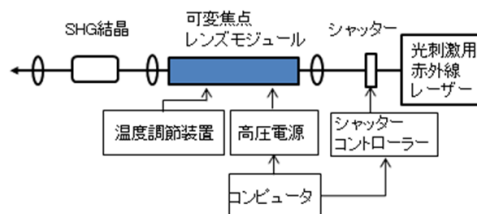


図 2 製作した装置のブロック図

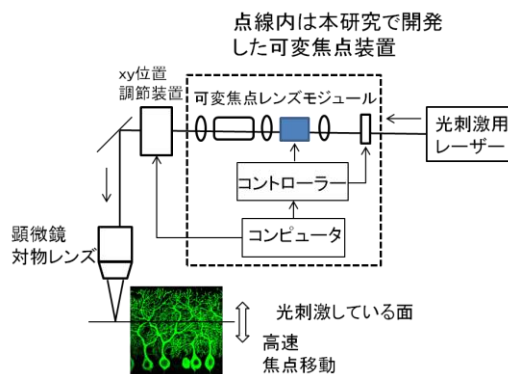


図 3 本研究開発の光刺激装置を組み込んだ光刺激・イメージング装置の模式図 (実際の光路図を簡略化して記載)

4. 研究成果

(1) KTN 結晶レンズ

図 4 に KTN 結晶レンズの外観を示す。KTN 結晶レンズに 0~1000V の電圧を付加すると焦点移動が起こる (図 5)。本装置の KTN 結晶レンズの焦点移動速度を計測したところ



図4 KTN 結晶レンズ

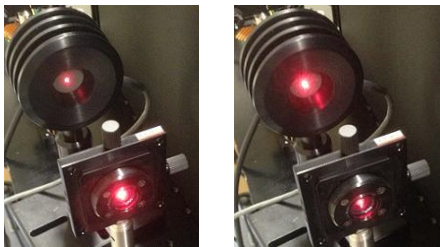


図5 KTN 結晶レンズに0~1000Vの電圧を印加した際の焦点移動。ピンホール（手前）を通り抜けた光量（後ろ）が変化しているのが分かる。

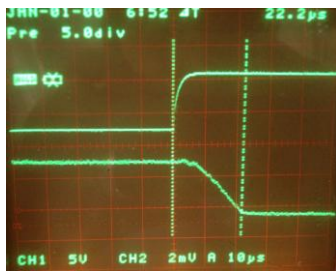


図6 本装置の KTN 結晶レンズの応答速度の測定。KTN 結晶レンズに0~900V の電圧を印加した際の応答。パルスの立ち上がりでは約 23 マイクロ秒で応答した。上: パルス発生装置のパルス。下 KTN 結晶レンズからの光強度 (図5 参照)。

パルスの立ち上がり時 (0V から 900V 負荷時) では~23 マイクロ秒で焦点移動した (図6)。なお、この実験に使用したパルス発生装置のパルスの立ち上がりは約5 マイクロ秒であった。また、遅延の大部分は高電圧発生装置の電圧の立ち上がりの遅れによると考えている。以上の様に本研究で開発した光刺激装置の焦点調節速度は現在主流の圧電素子を使用した技術より 500~1000 倍程度高速であった。

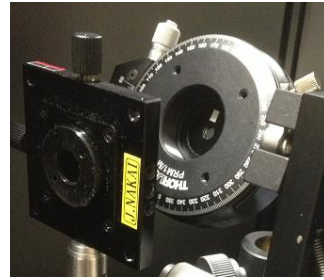


図7 約 29.2 度傾斜させた BBO 結晶

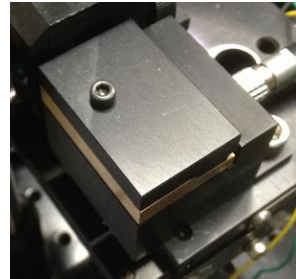


図8 ppKTP 結晶を保持し保温するための結晶ホルダー

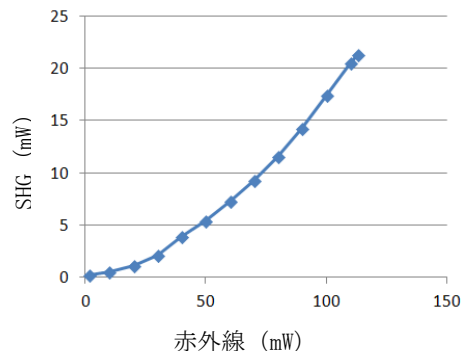


図9 使用した ppKTP 結晶による赤外線レーザーの強さと SHG 光の強さの関係。温度 30℃。

(2) SHG 発生

SHG の発生には非線形光学結晶を用いた。非線形光学結晶として 5 x 5 x 0.8mm の BBO 結晶 (CASTECH) と 1 x 2 x 30mm の ppKTP 結晶 (RAICOL Crystals) を試した。これらの結晶には AR コーティングを付してある。まず、1064nm/13mW の赤外線を使用した際のこの実験系でのレーザー強度を測定した。BBO 結晶による 532nm のレーザー光 (SHG) の発生は最大でも 9μW であった。BBO 結晶では SHG を発生させる際、結晶を約 29.2 度傾斜させる必要があった (図7)。また SHG 発生は赤外線レーザーの偏光方向に依存した。一方 ppKTP 結晶を用いた場合 (図8)、同じ 1064nm の赤外線でも 21.3mW の SHG が発生した。ppKTP 結晶でも SHG 発生は赤外線レーザーの偏光方向に依存した。したがって ppKTP 結晶を用い

る事により BBO 結晶の～2300 倍以上の効率で SHG を発生させることができた。ppKTP 結晶の方が変換効率が格段に高いため、今後は ppKTP 結晶により発生した SHG 光を用いて実験を行った。

次に赤外線レーザーの強さと発生した SHG 光の強さの関係を調べた(図 9)。図 9 に示すように、赤外線の強度に比例して SHG の強度が増加する事が示された。赤外線の強度が 113mW の際の波長変換の効率は 18.8%であった。また、使用した ppKTP 結晶の波長依存性についても検討した。図 10 に示す通り温度 30℃では 1060～1065nm の赤外線に変換効率が最大となった。図 11 に SHG の Far field 像を示す。KTN 結晶レンズへの 0～1000V の電圧印加により Far field 像が変化している事が分かる。

(3) 顕微鏡への導入

ppKTP 結晶により発生させた SHG 光をビームエキスパンダー及びレーザーミラーを用いて顕微鏡対物レンズに導入した(図 12)。KTN 結晶レンズへの 0～1000V の電圧印加により像の大きさが変化する事が観測された。焦点移動の際、本装置では対物レンズを移動せずに焦点移動できるため、焦点位置を高速で移動させても振動は発生しない。

本研究で開発した装置を用いて、光刺激の Z 方向の焦点調節を超高速で、しかも対物レンズを物理的に動かす事がないため無振動で行うことができた。本研究で開発した光刺激装置の焦点調節速度は現在主流の圧電素子を使用した装置の速度より 500～1000 倍程度高速であった。

本装置では顕微鏡の測定系の光路と異なる光路に入れることにより対物レンズの焦点位置(カルシウムイメージングを行っている焦点面)と同じ Z 面でも異なる Z 面でも光照射を行う事が可能である。

また、可変焦点装置にさらに工夫を加え、KTN 結晶レンズでは従来不可能であった短波長のレーザー光を取り扱う事ができる装置を考案した。これにより KTN 結晶レンズの扱える光の範囲が拡大し、紫外線から赤外線までいろいろな光を使用できるようになった。さらに、本装置では 2 光子励起用の高価なレーザーを使用しているが、パルスレーザーである必要はなく、よりローコストな赤外線レーザーを用いる事ができる。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

現在主流の圧電素子を使用した技術より 500～1000 倍程度高速化しており、けた違いの速さを実現した点でインパクトが大きい。また、本技術開発は単に脳科学を含む自然科

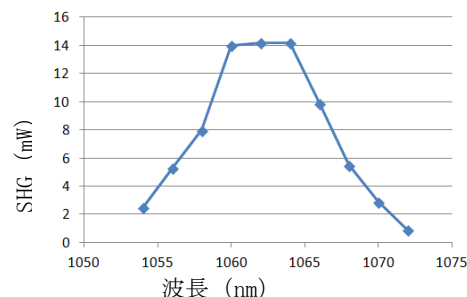


図 10 使用した ppKTP 結晶の波長依存性。温度 30℃。



図 11 KTN 結晶レンズへ印加する電圧を 0～1000V に変化させた際の ppKTP 結晶により発生させた SHG 光の Far field 像。

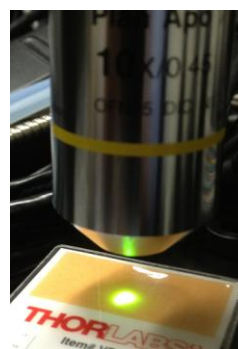


図 12 発生した 532nm の SHG 光を顕微鏡物レンズに導入した。

学分野の研究に利用されるだけでなく、工業、レーザー加工分野での利用も見込まれ、将来的に大きな市場が開ける可能性がある。

試作した装置の速度に相当する速度を達成できる他の装置としては音響光学デバイス(AOD)を用いた可変焦点レンズによる高速焦点移動装置が開発されている。しかし、AOD を 2 つ使うタイプでもレーザーパワーのロスが大きく半分以上の光が失われてしまう。また AOD を 2 つ使用するタイプではレーザービームを任意の位置に止める事ができない。AOD を 4 つ使うタイプではビームを任意の位置に止める事が可能になるがレーザーパワーロスが非常に大きく、レーザー出力は元の 4 分の 1 以下となってしまう。本装置の KTN 結晶レンズは透過性が高く元のレーザーパワーの 95%以上のレーザー出力が得られる。また、ビームを任意の位置に止める事

も可能である。さらにAODは原理上光の波長に依存して角度を調整する必要があり、波長可変レーザーに対応することは非現実的であるが、本研究で開発した装置では、後述するようにSHG変換に用いた非線形光学結晶の構造を工夫する事により簡単に波長可変にも対応することができる。

今後の展望

本装置では512nmのレーザー光への波長変換を行ったが、可変波長赤外線レーザーを用いる場合、SHG変換に用いた非線形光学結晶の構造を工夫する事により波長可変に対応可能となる。

本装置はDMDやL-COSなどと組み合わせることにより、多点同時刺激を行うことも可能である。DMDやL-COSとの組み合わせにより、より高度な光刺激が可能となると考えられる。

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 6件)

(1) Yoshida S, Shiratori H, Kuo IY, Kawasumi A, Shinohara K, Nonaka S, Asai Y, Sasaki G, BeloJA, Sasaki H, Nakai J, Dworniczak B, Ehrlich BE, Pennekamp P, Hamada H, Cilia at the Node of Mouse Embryos Sense Fluid Flow for Left-Right Determination via Pkd2、Science、査読有、338、2012、226-231
DOI : 10.1126/science.1222538

(2) Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A, Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system、Cell Rep、査読有、2、2012、397-406
DOI : 10.1016/j.celrep.2012.06.011

(3) Ohkura M, Sasaki T, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J、An improved genetically encoded red fluorescent Ca²⁺ indicator for detecting optically evoked action potentials、PLoS One、査読有、7、2012、e39933
DOI : 10.1371/journal.pone.0039933

(4) Ohkura M, Sasaki T, Sadakara J, Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura K, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J、

Genetically Encoded Green Fluorescent Ca²⁺ Indicators with Improved Detectability for Neuronal Ca²⁺ Signals、PLoS One、査読有、7、2012、e51286
DOI : 10.1371/journal.pone.0051286

(5) Muto A, Ohkura M, Abe G, Nakai J, Kawakami K, Real-time visualization of neuronal activity during perception、Curr Biol、23、査読有、2012、307-311
DOI : 10.1016/j.cub.2012.12.040.

(6) Tanaka M, Shih PY, Gomi H, Yoshida T, Nakai J, Ando R, Furuichi T, Mikoshiba K, Semyanov A, Itohara S, Astrocytic Ca²⁺ signals are required for the functional integrity of tripartite synapses、Mol Brain、6、査読有、2013、6
DOI : 10.1186/1756-6606-6-6

[学会発表] (計 2件)

① Ohkura M, Nakai J、Development and application of G-CaMP-type genetically encoded Ca²⁺ indicators、2012 Fall Janelia Conference “Fluorescent Proteins and Biological Sensors III.” (招待講演) 2012年11月04日～2012年11月07日、Ashburn USA

② Gengyo-Ando K, Usami A, Kagawa-Nagamura Y, Ohkura M, Ikegaya Y, Matsuki N, Nakai J、Dynamic neuromuscular regulation in freely crawling *C. elegans*: multicellular Ca²⁺ imaging using GCaMPs、第35回神経科学学会年会 (招待講演) 2012年09月18日～2012年09月21日名古屋国際会議場

[その他]

ホームページ等
埼玉大学脳科学融合研究センター
<http://subs1.saitama-u.ac.jp/>

報道関連情報

(1) Kawabata I, Kashiwagi I, Obashi K, Ohkura M, Nakai J, Wynshaw-Boris A, Yanagawa Y and Okabe S : Moving synapses on developing neurons. Nature 姉妹誌注目のハイライト、2012年3月7日。

(2) 日経産業新聞: Muto A, Ohkura M et al, CurrentBiology 23, 1-5, 2013の論文に関する記事が掲載された。内容: 脳活動生きたまま観察. 報道年月日: H25. 2. 13

Muto A, Ohkura M et al, Current Biology 23, 1-5, 2013の論文が国内外のインターネットサイト(以下)に大きく取り上げられた。

①ロイター

<http://www.reuters.com/news/video?videoChannel=6>

②サイエンスマガジン

<http://news.sciencemag.org/sciencenow/2013/01/whats-your-fish-thinking.html>

③サイエンティフィックアメリカン

<https://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=scientists-watch-a-fish-think>

④ナショナルジオグラフィック

<http://phenomena.nationalgeographic.com/2013/01/31/fish-watches-food-scientist-watch-fishes-thoughts/>

⑤ワイアード

<http://www.wired.com/wiredscience/2013/02/fish-neuron-video/>

⑥ニューサイエンティスト

<http://www.newscientist.com/article/dn23123-fluorescent-protein-lets-us-read-a-fishes-thoughts.html>

⑦ネイキッドサイエンティスト

<http://www.thenakedscientists.com/HTML/content/news-archive/news/1000067/>

⑧ロサンゼルスタイムズ

<http://www.latimes.com/news/science/sciencenow/la-sci-sn-fish-thought-brain-swim-zebrafish-20130131,0,5543599.story>

⑨マイナビニュース

<http://news.mynavi.jp/news/2013/02/01/182/>

⑩カラパイア

<http://karapaia.livedoor.biz/archives/52116852.html>

⑪GIZMOND 世界初！ 脳の電気的な動きをリアルタイムで可視化

http://www.gizmodo.jp/2013/02/post_11642.html

⑫コモンポスト

<http://commonpost.info/?tag=%E3%82%BC%E3%83%96%E3%83%A9%E3%83%95%E3%82%A3%E3%83%E3%82%B7%E3%83%A5>

⑬アメーバニュース

<http://news.ameba.jp/20130214-547/>

(3) 大倉正道: 蛍光分子センサーの開発と神経回路研究への応用. 日本経団連 埼玉経協ニュース 371, 18-18, (2012).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 淳一 (NAKAI JUNICHI)
埼玉大学・脳科学融合研究センター・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 (ANDO KEIKO)
埼玉大学・脳科学融合研究センター・特任准教授
研究者番号: 40221741

(4) 研究協力者

大倉 正道 (OHKURA MASAMICHI)
埼玉大学・脳科学融合研究センター・准教授
研究者番号: 70369172