

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2013～2013

課題番号：25560423

研究課題名(和文) 波長可変レーザーを用いた次世代光刺激装置の開発

研究課題名(英文) Next generation photostimulation system using tunable laser

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：最近、チャンネルロドプシン等の光感受性機能分子が飛躍的な発展を見せ、脳研究のさらなる発展が期待できるようになってきた。一般に細胞など光刺激したい標的は脳内に3次元的に分布している事が多い。しかし、現在の技術では3次元空間の複数の標的に同時にレーザー照射することは困難である。Z軸方向の深さが異なる標的に同時にレーザー光の焦点を合わせることが目的に、本研究では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を用いて3次元空間に分布する光感受性機能分子に高速で焦点調節可能な顕微鏡用光刺激装置を開発した。本技術により光操作技術がさらに進歩し、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 tunable wavelength photo-stimulation equipment. We could generate second harmonic waves ranging from ~400 nm to ~500 nm with a fun-out type periodically polarized crystal. So this equipment can photo-stimulate GFP, channelrhodopsin, and many other photosensitive molecules. In the system we also equipped a pair of potassium tantalate niobate (KTN) crystals 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 ~20 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 brain science but also industrial field such as laser processing and laser measurement.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：基盤・社会脳科学

キーワード：オプトジェネティクス 光遺伝学 KTN結晶 第二高調波発生

1. 研究開始当初の背景

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、Ca²⁺イメージング等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。研究代表者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標的は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レーザー照射が行えるとよいが、現実には技術的に困難である。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。

研究代表者は顕微鏡の焦点を高速で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 (特許申請中 特願 2012-197366)。KTN 結晶は、電気的に超高速で屈折率を変えられる利点があるが、現状では長波長の光 (~700 nm 以上) しかハイパワーで安定に利用できない。そこで我々は、KTN 結晶と波長変換技術を組み合わせ紫外線~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実験を行った (H24 年度科研費挑戦的萌芽研究にて実施)。このアイデアを発展させ、本研究ではさらに波長可変を可能にし、種々の分子の励起に対応できる超高速焦点移動可能な光刺激装置の開発を行った。

2. 研究の目的

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。本研究では光感受性機能分子を励起するための光刺激装置を開発する。細胞やシナプスなど光刺激したい標的は脳内に3次元的に分布している事が多い。しかし、今の技術では3次元空間の複数の標的に瞬時にレーザー照射することは困難である。研究代表者はこれまで KTN 結晶を使用した可変焦点レンズ (KTN レンズ) を用いてレーザーの焦点調節を飛躍的に高速化した光刺激装置の研究に取り組んできた。本申請ではこの技術をさらに発展させ新たに波長可変赤外レーザーと波長変換技術を組み合わせ、発生させた可視光レーザーの波長を自由に設定でき、しかも高速に焦点調節可能な顕微鏡用光刺激装置を開発する。本研

究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で大きな前進が期待できる。

3. 研究の方法

KTN 結晶を使用した可変焦点レンズを用いて、電圧を制御することにより超高速で焦点調節を行う。

KTN 結晶で短波長のレーザー光を使用できるようにする仕組み

現状の KTN 結晶では短波長の光の利用は困難である。そこで、第二高調波発生 (SHG) による波長変換を行うことにした。SHG とはリチウム・トリボレートなどの結晶が、元の波長の半分の波長の光を生成する現象である (図1参照)。SHG 結晶として周期分極反転 (pp) 結晶を用いる。(H24 年度科研費の研究にて我々は pp 結晶を用いてすでに 10% 以上の効率で波長変換できることを実証している。)

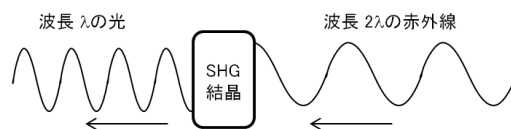


図1 SHG 結晶による波長変換

波長可変の仕組み (図2参照)

波長変換用の pp 結晶の周期分極の間隔は波長依存性であるので、レーザーの波長に対応した周期分極間隔の結晶を用いる必要がある。そこで、新たに pp 結晶の構造を工夫し扇型にし、1つの結晶で広い波長範囲で波長変換できる結晶を作成することにした。波長可変赤外レーザーを組み合わせることで連続的に広い波長範囲の光 (例えば 380~540nm) を発生できる。

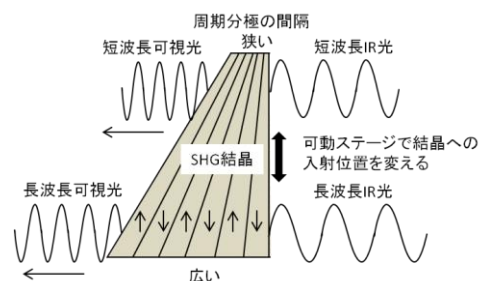


図2 波長可変に対応した SHG 結晶 (扇型 pp 結晶) の原理

(1) 装置開発:

図3に示された装置を開発した。可変焦点

レンズは赤外線では問題なく使えるため、KTN 結晶が組み込まれた可変焦点レンズモジュールの後に、SHG 結晶を配置し、SHG 結晶により赤外線の半分の波長をもつ光を発生させた。これによって原理的に、短波長のレーザー光で、KTN 結晶を利用して超高速焦点移動を行うこととほぼ等価な操作が可能になる。波長可変レーザーで赤外線の波長を変え、対応する SHG 結晶の調整は可動ステージを用い SHG 結晶を移動させて行なった。

SHG 結晶は温度コントローラーにより一定温度に保った。可変焦点レンズモジュールはコンピュータより電圧をコントロールして焦点位置を変えた。シャッターおよびパワー制御はコントローラーを介してコンピュータから制御した。

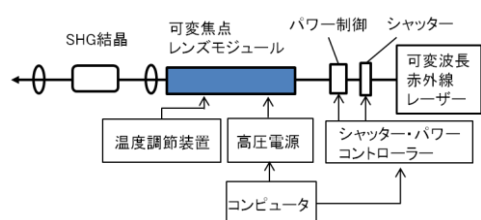


図3 製作した装置のブロック図
SHG 結晶は可変波長レーザーに対応するため扇型 pp 結晶を用いた。

(2) 取り付け：

顕微鏡の落射蛍光ユニットを利用して開発する装置を正立顕微鏡に取り付けた。レーザーは x y 面の照射位置を調整する装置を介して光を顕微鏡に導入した。

(3) 装置のテスト・調整：

蛍光サンプルにて照射実験を行い、装置の動作確認・調整を行った。調整は、光刺激により蛍光を発するサンプルで画像を CCD カメラにて撮影し、焦点移動を確認した。また、光検出器を用いて動作速度の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 装置開発：

赤外可変波長フェムト秒レーザー光源として Chameleon Vision II(コヒーレント)を用いた。電磁シャッター、パワー制御部の様子を図4左図に示す。

また、可変焦点レンズは KTN レンズ (NTT アドバンステクノロジー) を使用した。レンズはペルチエ素子により温度制御した。扇型 pp 結晶として (L)3 x (W)20 x (T)0.8 mm の ppMgSLT 結晶(オキサイド)を用いた。結晶には AR コーティングを付していない。

ppMgSLT 結晶については普通温度制御を行

うが、今回はチューニングが可能な扇型 pp 結晶であるため、温度の違いによる SHG 発生の影響は結晶の位置によるチューニングで対応した (図5)。

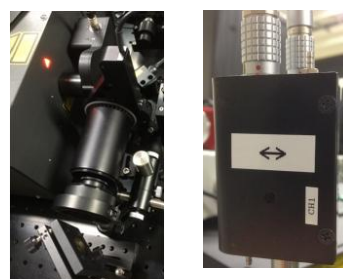


図4 シャッター、パワー制御部 (左) と KTN レンズ部 (右)



図5 扇型 pp 結晶 (手前) と発生した SHG 光 (奥)
IR レーザーは波長 976nm、発生した SHG 光は 488nm。

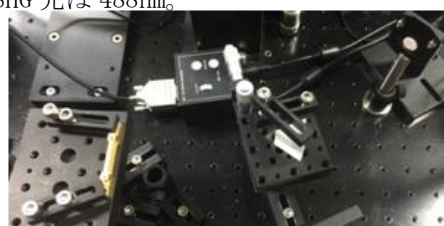


図6 プリズム (中央) にて赤外光と SHG 光を分離し、観察した。



図7 プリズムにて分離された SHG 光 (左) と赤外光 (右)。なお、赤外線はターゲットに塗られた蛍光塗料により可視化した。

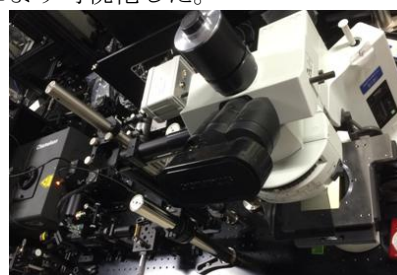


図8 装置の全景

プリズムを用いて発生した SHG 光と元の赤外線光を分離して観察した (図 6、7)。これより扇型 pp 結晶により SHG 光を発生されることが可能であることが明らかとなった。発生させた SHG 光の波長範囲は 390 nm ~ 505 nm で、ほぼ設計通りの性能が得られた。

(2) 取り付け：

扇型 pp 結晶により発生させた SHG 光を、レンズ、フェムト秒レーザーミラー、XY 軸調整ミラーを用いて顕微鏡に導入した。この際 SHG 光と元の赤外線光はダイクロイックミラーおよびブロッキングフィルターにより分離し、SHG 光のみを顕微鏡に導入した。図 8 は装置全景である。

図 9 はステージに投影された SHG 光の像であるが、ガウシアンビームに近い像が得られた。

(3) 装置のテスト・調整：

20x 対物レンズを取り付け、GFP を神経系に発現する線虫サンプルを用いて装置のテスト、調整を行った (図 10)。

対物レンズの焦点に集光された SHG 光は強く、GFP が明るく光り、肉眼でも十分観察できた。そこで KTN レンズ直前のレーザーパワーを 7 mW に調整し、この後の実験を行った。

KTN 結晶レンズへの 0 ~ 400V の電圧印加により蛍光画像が変化する事を観測した (図 11)。なお、KTN レンズの channel 1, 2 の容量は両方とも 1.39 μ F で実験を行った。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かった。

次に、KTN レンズの動作速度を測定した。10x 対物レンズ下にフォトダイオード型光検出器を置き、焦点移動による光強度の変化を電気信号に変換してストレージオシロスコープで観察した (図 12)。その結果、高圧電源の電圧変化に対応して光り信号が変化することが観察され、シグナルの始まりから 20 μ 秒以内に光り信号が安定化することが分かった。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

KTN レンズは現在主流の圧電素子を使用した技術より 500 ~ 1000 倍のけた違いの速さを持っており速さに対するインパクトは非常に大きなものがある。

今回あらたに可変波長レーザー光源に対応し、390 nm ~ 505 nm までの波長範囲で、自由に SHG 光を作り出せるようになったことにより、各種の蛍光分子、また光感受性分子

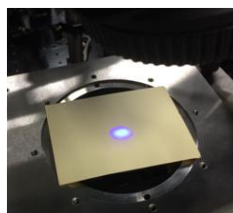


図 9 発生した SHG 光を顕微鏡に導入したところ

青い光がステージの中央に見られる。なお、対物レンズはこの写真では外してある。

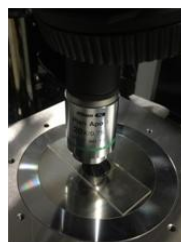


図 10 生物試料を用いた検討。GFP を神経細胞に発現する線虫を用いて焦点移動を検討した。

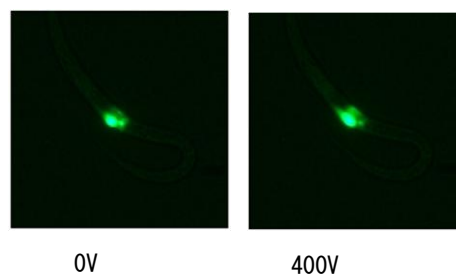


図 11 生物試料を用いた検討。GFP を神経細胞に発現する線虫を用いて焦点移動を検討した。電圧 (400V) を印加することにより焦点位置が変わることが分かる。対物レンズ：PLAN APO 20x0.75 Nikon



図 12 装置の応答速度の測定
上トレース：高圧電源の電位モニター、下トレース：光検出器から得られたシグナル。電位の変化にほぼ追従して光検出器から得られた信号の変化はほぼ電源電圧の変化に追従している。

を活性化できるようになった。本技術開発は単に脳科学を含む自然科学分野の研究に利

用されるだけではなく、工業、レーザー加工、計測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が、今回種々の波長の光を生成できるようになったことでさらに応用範囲が広がった。

今後の展望

本装置では390nmから505nmの範囲のSHG光を1つのpp結晶で発生させることに成功したが、理論的にはさらに長い波長のSHG光にも1つのpp結晶で発生させることが可能である。より赤い波長の光は生体内での散乱を軽減できるため重要である。赤外線レーザー光源自体も長波長の物が開発されており、また光源にOPOなどを用いることも可能で、こうした光源を用いることにより紫外光から赤色光までのSHGを発生させて、焦点調節を瞬時に行う事が可能になると考えられる。

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 3 件)

① Hiroi M, Ohkura M, Nakai J, Matsuda N, Hashimoto K, Inoue K, Fiala A, Tabata T, Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in *Drosophila*, *Genes Cells*, 査読有、18、1070-1081、2013
DOI: 10.1111/gtc.12094

② Mera T, Itoh T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M, Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y, Pretreatment of donor islets with the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation, *Am J Transplantation*, 査読有、13、2154-2160、2013
DOI: 10.1111/ajt.12306

③ 大倉正道, 中井淳一, 蛍光Ca²⁺プローブタンパク質を用いた神経細胞とアストロサイトのCa²⁺イメージング、*日本薬理学雑誌*、査読無、142、226-230、2013

[学会発表] (計 13 件)

① 大倉正道, 武藤彩, 阿部玄武, 川上浩一, 中井淳一, 改良型緑色蛍光カルシウムプローブ蛋白質G-CaMP7aを用いたゼブラフィッシュの視覚認知における神経活動の可視化、第87回日本薬理学会年会、2014年03月19日~2014年03月21日、仙台国際センター

② 大澤明香音, 安藤恵子, 永村ゆう子, 大倉正道, 中井淳一, 難治性てんかんの責任遺伝子Munc18-1変異の機能解析、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月03日~2013年12月06日、神戸国際会議場

③ Sato M, Mizuta K, Kawano M, Takekawa T, Islam T, Yamakawa H, Yamaguchi Y, Fukai T, Ohkura M, Nakai J, Hayashi Y, Hippocampal CA1 network dynamics during locomotion in virtual reality, *Neuroscience* 2013、2013年11月09日~2013年11月13日、San Diego(USA)

④ Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M, Operant conditioning of single-neurons in mouse motor cortex by two-photon calcium imaging, *Neuroscience* 2013、2013年11月09日~2013年11月13日、San Diego(USA)

⑤ 佐藤正晃, 水田恒太郎, 河野真子, 竹川高志, イスラムタンビル, 山川宏, 山口陽子, 深井朋樹, 大倉正道, 中井淳一, 林康紀, 生体における海馬神経回路活動の可視化、第36回日本神経科学大会、2013年06月20日~2013年06月23日、京都国際会館

⑥ 小出哲也, 脇阪紀子, 宮坂信彦, 大倉正道, 中井淳一, 吉原良浩, ゼブラフィッシュ嗅球における匂い地図の包括的解析、36回日本神経科学大会、2013年06月20日~2013年06月23日、京都国際会館

⑦ 丸岡久人, 中川直, 佐伯麻衣, 松本直実, 大倉正道, 中井淳一, 細谷俊彦, 大脳新皮質第5層の皮質外投射ニューロンが構成する微小機能単位の機能解析、36回日本神経科学大会、2013年06月20日~2013年06月23日、京都国際会館

⑧ 真仁田聡, 鈴木崇之, 松元崇, 本間千尋, 山田一之, 太田桂輔, 小田川摩耶, 松原智恵, 大倉正道, 佐藤正晃, 中井淳一, 林康紀, ラーカムマッシュー, 村山正宜, 二次運動野からのトップダウン入力による体性感覚の制御、36回日本神経科学大会、2013年06月20日~2013年06月23日、京都国際会館

⑨ 貞莉純子, 大倉正道, 佐々木拓哉, 安藤恵子, 永村ゆう子, 小林千晃, 池谷裕二, 中井淳一、高感度な改良 G-CaMP カルシウムプローブを用いた樹状突起棘における発火閾値下のシナプス入力の可視化、36 回日本神経科学大会、2013 年 06 月 20 日～2013 年 06 月 23 日、京都国際会館

⑩ 永村ゆう子, 安藤恵子, 大澤明香音, 橋本浩一, 大倉正道, 中井淳一、自由運動中の線虫の光刺激とカルシウムイメージングを可能とするシステムの開発、36 回日本神経科学大会、2013 年 06 月 20 日～2013 年 06 月 23 日、京都国際会館

⑪ 中井淳一, 大出孝博, 今井欽之, 小林潤也、可変焦点レンズを持った二光子蛍光イメージングの焦点調節の高速化、応用物理学会 2014 年春季講演会、2014 年 03 月 17 日～2014 年 03 月 21 日、青山学院大学

⑫ Nakai J, Ohkura M, Gengyo-Ando K、Analysis of *C. elegans* neuromuscular system with genetics, imaging and optogenetics、The conference at International Institute for Advanced Studies, Novel developments on the study of life and biological systems based on genome engineering and imaging science (招待講演) 2014 年 02 月 27 日～2014 年 02 月 28 日、International Institute for Advanced Studies (Nara)

⑬ 中井淳一、蛍光カルシウムプローブタンパク質を用いたバイオイメージング、日本化学会関東支部栃木地区講演会 (招待講演)、2013 年 12 月 09 日～2013 年 12 月 09 日、宇都宮大学

[図書] (計 2 件)

① 大倉正道, 中井淳一、エヌ・ティー・エス、蛍光バイオセンサーの開発. 『進化分子工学～高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発～』、424(267-273)、2013

② 大倉正道, 中井淳一、エヌ・ティー・エス、光遺伝学ツールを用いた光制御および蛍光測定手法の開発. 『オプトジェネティクス～光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線～』、324(107-117)、2013

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[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・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