

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名	革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト	
研究開発課題名	霊長類脳の単一ニューロンレベルの機能マップを可能にする革新的イメージング技術の開発	
機関名	国立大学法人埼玉大学	
研究開発 担当者	所属 役職	大学院理工学研究科 教授
	氏名	中井 淳一

2. 研究開発成果の内容

① 光プローブの開発

①-1 光プローブの作製

赤外線 (IR) 蛍光タンパク iRFP にカルシウム結合部位であるカルモジュリン部分とカルモジュリンが結合するミオシン軽鎖キナーゼの M13 部分を融合させて新たにカルシウム蛍光タンパク質の遺伝子を作製した。また、平成 26 年度に得られたプロトタイプ (i14) に変異を導入し新たにカルシウム蛍光タンパク質の遺伝子を作製した。さらに赤色蛍光カルシウムプローブ R-CaMP にカルモジュリン、M13、iRFP 等を融合させて、FRET 型プローブを作製した。

①-2 光プローブの評価

作製したカルシウムプローブを培養細胞に発現させ、レーザー導入ユニット、顕微鏡用スキャンヘッドを用いて、発現状態やカルシウム感受性について評価した。結果、iRFP 単独ではプロトタイプ i14 を超えるカルシウムイオン濃度変化を示すカルシウムプローブを得ることはできなかった。一方、FRET 型融合プローブでは近赤外領域において最大蛍光変化量 4 を示すプローブを得ることができた。

② 高速可変焦点レンズを用いた 3D イメージング技術の開発

②-1 装置の試作

Optical Parametric Amplifier (OPA) 機能を持った多光子励起用レーザーを導入し、iRFP に対応した多光子顕微鏡を製作した。また、KTN 可変焦点レンズを用いた XZ スキャン実験系を構築した。

②-2 性能評価

②-1 の多光子顕微鏡を用い培養細胞、線虫で実験を行い、iRFP の多光子画像を取得できることを確認した。iRFP のマウスでの実験は iRFP のウイルスベクターの作成が平成 27 年度中に完成しなかったため、マウスでの性能評価は行わなかった。また、KTN 可変焦点レンズを用いて 2KHz で XZ 高速スキャンすることに成功した。これは世界的にもトップクラスのスキャン速度で、さらに高速化することが十分可能である。

③ 4D内視鏡技術の開発

③-1 装置の試作

ボイスコイルを用いた高速可変焦点光学系を開発し平成26年度に試作した4D内視鏡(1号機)に取り付けた。しかし1号機で不具合が発生したため設計仕様を変更し新たに2号機(内視鏡型顕微鏡用光学部品)を試作した。また、光線追跡、収差のシミュレーションを行い1mm径GRINレンズおよび先端にプリズムを装着したGRINレンズを新たに試作した。

③-2 性能評価

疑似サンプル、線虫、マウスを用いて4D内視鏡の性能を評価した。1mm径GRINレンズおよび先端にプリズムを装着したGRINレンズとも多光子画像を取得することができた。1号機では異常振動が発生し高速動作が困難であったが、新たに開発した2号機では1mm径GRINレンズを用いて600Hzまで高速に焦点移動することが可能であった。焦点移動範囲はレンズ先端から約100 μ mであった。

④ プロジェクトの総合的推進

平成28年2月9日に国立大学法人埼玉大学において、研究代表者、研究分担者、研究協力者が出席した研究推進室会議を開催し、進捗状況について確認するとともに、今後の進め方について議論し、意識合わせを行った。