

## 平成 18 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 19 年 2 月 28 日提出

|  |                           |      |               |
|--|---------------------------|------|---------------|
| ふ り が な  | こじま ひろし                   | 所属・職 | 玉川大学 工学部      |
| 開発代表者名   | 小島 比呂志                    |      | 知能情報システム学科 教授 |
| 開発課題名  | 多点高速刺激システム開発とその神経機能解析への応用 |      |               |
| <p><b>開発経過及び成果</b>（開発目標に対する成果を計画書に記載した内容に対応させて記載すること）</p> <p>中枢神経系の機能研究で最も重要なテーマにシナプス伝達特性とその制御機構の研究がある。そのために我々は、uncaging を応用して微小領域を高速多点で刺激できる装置を開発した。その基本仕様は、以下の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Focal point-size of laser-spot for uncaging (diameter): less than <math>3\mu\text{m}</math></li> <li>2. Illumination time ( “uncaging park time” ) (depending on required laser energy): Adjustable from 10 <math>\mu\text{s}</math> to 1sec</li> <li>3. Time interval between two spots is less than 1ms for distance 10-40 <math>\mu\text{m}</math>: 1…2ms for distance 40-100 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>4. Bleach functionality can be triggered, Time series can be triggered, Sync signal is set at each spot illumination (time for the pulse according to the illumination time)</li> <li>5. Maximum field of view with objective W Achroplan 40× 0.8NA: <math>325\mu\text{m} \times 325\mu\text{m}</math></li> <li>6. Number of points for uncaging is 12 on display but can be higher</li> <li>7. Light source for uncaging UV-laser Enterprise II: 80mW output power introduction of UV-laser through objective lens (W Achroplan 40× 0.8NA recommended)</li> </ol> <p>この装置を応用して、以下の実験を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 海馬錐体細胞及び小脳急性スライス標本プルキンエ細胞の樹状突起と細胞上の多点を <math>3\mu\text{m}</math> 以下の径に絞った紫外線 (351, 364nm 波長) レーザーで照射した。 標本の灌流溶液 (ACSF) 中に MNI-caged-L-glutamate を数百 mM オーダの濃度で溶解し、上記のレーザービームで uncaging を行った。 細胞体を電位固定しながら電流記録を行った結果、レーザービーム照射点付近に存在するグルタミン酸受容体の活性化に伴う電流が記録された。 その大きさは、約数 10pA で、数 10msec の時間経過の速い電流応答であった。</li> <li>2. 複数点刺激に伴ってそれぞれの点に対応する電流反応が得られ、複数回の同一パターンの刺激に対して再現性よく同じ時系列及び大きさの電流反応が記録された。 これらの uncage を行う直前に細胞の形態を記録するためにパッチパイペット内液に Calcium Green1 や Alexa568 などの蛍光色素を適当な濃度で混入し 800nm の赤外線レーザによる 2 光子イメージングや 548nm GreenHeNe レーザによる共焦点イメージングを行った。</li> <li>3. 解剖学的な神経連絡を確認するために、神経線維を投射している細胞の細胞体を比較的大きなエネルギーの紫外線レーザーを用いて興奮 (活動電位を発生) させた。 この神経細胞からシナプス結合を受ける他の神経細胞から電気信号を記録した。 これによって、解剖学的に知られている投射の機能的な神経連絡が確認された。</li> <li>4. uncaging の空間分解能を上げるために赤外線レーザービームによる 2 光子 uncaging を行った。 これにより紫外線レーザーによる 1 光子 uncaging に比較してさらにより空間分解能で刺激をすることが明らかになり、同時に細胞体から記録された惹起電流も時間分解能がよいものが得られた。</li> </ol> |                           |      |               |

本システム開発に関する成果発表：

「学会・シンポジウム・研究会など」

1. 2006年3月31日 第38回日本生理学会（前橋市） ランチョンセミナー 多点高速光刺激、スペクトル分析、高速イメージングを可能とする Zeiss のイノベーション 小島 比呂志
2. 2006年3月29日 第38回日本生理学会（前橋市） 口頭発表 海馬CA1でのれん合成LTPのイメージング解析 小島 比呂志
3. 2006年2月21日 脳機能解析新技術研究会（仙台市） 口頭発表 多点高速神経刺激システムとその神経機能かいせきへの応用 小島 比呂志
4. 2006年7月 第29回日本神経科学学会（京都市） ランチョンセミナー UVレーザーuncaging刺激と神経機能解析 小島 比呂志
5. 2006年7月 第29回日本神経科学学会（京都市） A system for rapid uncaging in defined patterns and its application. 小島 比呂志
6. 2006年8月 先端脳ワークショップ（札幌市） Development of UV-laser uncaging system and its application to neural function analysis. 小島 比呂志
7. 2006年10月 北米神経科学学会大会（アトランタ市、米国） Multi-point synaptic activation by UV-laser uncaging system. H. Kojima, E. Simbuerger, C. Boucsein, T. Maruo, M. Tsukada, S. Okabe, Ad. Aertsen
8. 2006年5月 H. Kojima, Invited Seminar at Colloquium Tsukuba University, Department of System Information Engineering Fast multi-point uncaging system and its application to experimental and computational neuroscience.

「レフリーつき論文」

1. Kojima, H., Simbuerger, E., Boucsein, C., Maruo, T., Tsukada, M., Okabe, S., Aertsen, Ad. (2006) Ultraviolet Laser Beam and Confocal Microscopy ---A system for Rapid Patterned Photolysis----. Page(s): 66-74, volume 22, Issue 6, *IEEE Circuit and Device (Leos) Magazine*
2. Tsukada, M., Yamazaki, Y., Kojima, H. (2006) Interaction between the Spatio-Temporal Learning Rule (STLR) and Hebb type (HEBB) in single pyramidal cells in the hippocampal CA1 Area. *Cognitive Neurodynamics* (in press)

#### 開発成果を踏まえた今後の展開

1. さらに複雑な時空間パターンを持つ刺激を神経細胞および局所神経回路網に与えることを可能にするために、任意の刺激パターンを入力できるように uncaging 用マクロプログラムのバージョンアップを行う。特に、実験者が、欲する刺激パターンをファイルの形式で読み込んで実行できるかどうかの可能性を検討する（現在開発担当者である Carl-Zeiss 本社で検討中）。これによって、現在12点まで刺激できる今回のシステムをさらに性能のよいものにすることができ、種々の神経理論上興味ある研究が可能になる。
2. 現在、紫外線及び赤外線レーザーによる uncaging を行う場合、uncaging 領域の微小な空間分解能を正確に測定していない。現時点での空間分解能は、蛍光色素の bleaching の痕跡を直接測定することにより決定している。より正確な uncaging ビーム径を測定するために caged-fluorescent 色素を利用し（例として caged-Rhodamine などの使用を検討中）、より正確

な uncaging 微小領域の測定を行う。この実験で得られた値と電気信号によって決定された機能的な空間分解能との比較検討を行う。

3. 共焦点を使ったイメージングの現在までの実験で、赤い光の検出器の感度は他社の検出器と比較して遜色ないが、緑色光の検出器の感度は劣っていることがわかっている。したがって、緑色光の検出器 (PMT) をより感度のよい高性能のものにバージョンアップする必要がある。

特に、現在のシステムは、共焦点顕微鏡 LSM510 Meta をベースに uncaging 用実験のための特注部分を加えたため、2光子イメージングのための non-descanned 検出器 (NDST) を装備していない。すなわち、DuoScan (uncaging 用ガルバノミラーを含むコントロール・ユニット) を本来、2光子イメージングのための non-descanned 検出器 (NDST) を接続するポートに装着している。その結果、2光子イメージングを内部検出器で行っている。この点を改良する必要性もある。したがって、上記の緑色光の検出器をより明るいものにする点をも含めて内部検出器のバージョンアップを計画している。