

培養神経細胞のシナプス領域の局在を的確に捉えた高解像度の共焦点イメージング

横浜市立大学大学院生命医科学研究科生体機能医科学研究室の竹居光太郎 教授、西田遼平 博士研究員らの研究グループは、神経回路形成因子LOTUSが、記憶に関連する脳部位である海馬において、神経細胞のつなぎ目であるシナプスの形成や記憶機能に与える影響について研究を進めている。本アプリケーションノートでは、共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rを使用し、本顕微鏡の特長である高解像度や広視野といった特徴を活かして、シナプス領域のマーカ分子の局在を的確に捉えた共焦点イメージングのアプリケーション事例を紹介する。

研究の概略

海馬の神経細胞は、シナプスの可塑性によって記憶や学習に関する高次脳機能を担う。シナプスは恒常的に形成と除去を繰り返しているが、シナプス除去に関わる因子としてNogoが知られている。NogoはNogo receptor-1(NgR1)と結合してシナプス密度の低下を引き起こすが、竹居教授らの研究で発見されたLateral olfactory tract usher substance (LOTUS)はNgR1の内在性アンタゴニストであるため、NogoとNgR1の結合を抑制してシナプス密度の低下を抑える。LOTUS欠損マウス由来の海馬初代培養神経細胞において、ポストシナプス部位のマーカ分子であるPSD-95とプレシナプス部位のマーカ分子であるBassoonが隣接した部位をシナプスと同一として計測したところ、これらのシナプス密度は野生型マウス由来の神経細胞と比較して有意に少ないことが示された。さらに、このマウスの記憶形成能力は野生型マウスに比して低下していることも分かった。これらのことからLOTUSがシナプス形成や記憶機能に関わる重要なタンパク質であることが明らかとなった。ここではマウス海馬初代培養神経細胞の観察事例を紹介する。

AX Rによる高解像度の画像取得

共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rは、ガルバノスキャンモードでは最大8K x 8K、レゾナントスキャンモードでは2K x 2Kの高いピクセル解像度を有するという特長を持つ。図1はマウス海馬神経初代培養細胞の共焦点顕微鏡画像である。細胞体から伸長した樹状突起は、MAP2（樹状突起マーカ）をAlexa 647で染色することにより可視化した。また、シナプスは、PSD-95（ポストシナプスマーカ）をAlexa 488で、Bassoon（プレシナプスマーカ）をAlexa 594で免疫染色することにより可視化した。図1aはガルバノモードを使用し、ピクセル解像度8Kで対象全体を撮像している。従来機種と比べ、面積比2倍となるΦ25mmの広視野により、観察領域を広く、俯瞰して観察することが可能である。図1b, 1cは特定の領域の拡大表示であるが、AX Rの高解像度により、ポストシナプスとプレシナプスが隣接する場所（シナプス部位）を的確に観察できている。この事例は、本顕微鏡の広い視野によって、対象全体を取得し、画像取得後に効率的に解析領域を見つけ出すことができること、ならびに、高いピクセル解像度によって、的確にターゲットの局在を特定できることを示している。

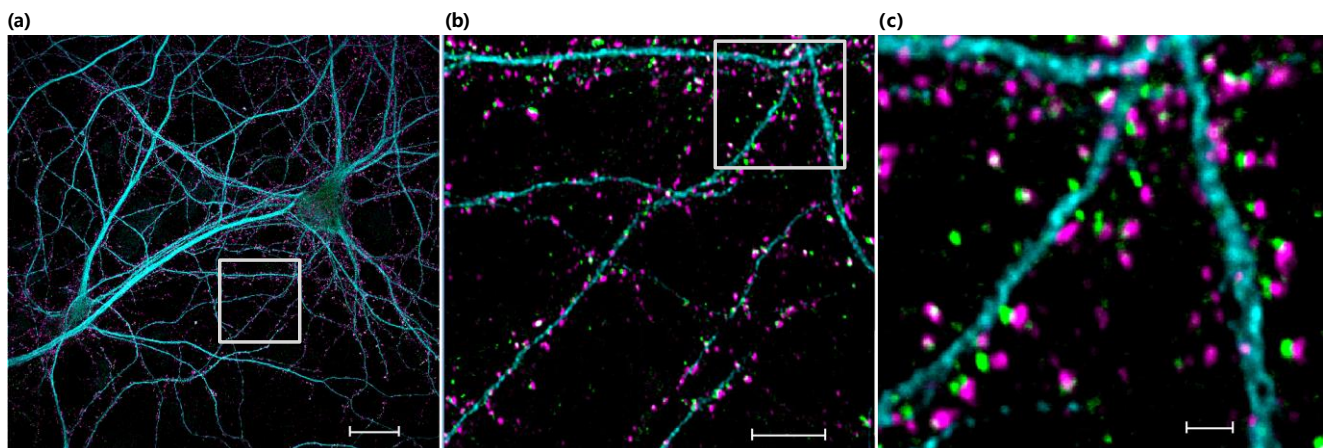


図1. マウス海馬神経初代培養細胞の共焦点顕微鏡画像

培養14日目のマウス海馬神経初代培養細胞、緑色：PSD-95；ポストシナプスマーカ（Alexa 488）、マゼンタ：Bassoon；プレシナプスマーカ（Alexa 594）、水色：MAP2；樹状突起マーカ（Alexa 647）、スケールバー：図1a；20 μm、図1b；5 μm、図1c；1 μm、対物レンズ：CFI アポクロマート TIRF 100XC Oil

サンプルご提供：横浜市立大学大学院生命医科学研究科生体機能医科学研究室 竹居光太郎 教授、西田遼平 博士研究員

NIS-Elementsでターゲットの局在を解析

次に、共焦点レーザー顕微鏡システムAX RのイメージングソフトウェアNIS-Elementsの画像解析ツールを用いて、ポストシナプスとプレシナプスが隣接して局在する場所、すなわちシナプス部位を同定し、その個数密度を計測した事例を紹介する。計測の手順を図2に示す。まず、全体画像から興味のある領域（図2a）を切り出して、チャンネルごとに2値化処理を実行した。図2b、2cが、それぞれポストシナプス、プレシナプスの位置を特定した図である。次に、ポストシナプスとプレシナプスが隣接する場所（シナプス部位）を特定して図示したものが図2dとなる。さらに、その中でも樹状突起の近傍に存在するものだけを特定したターゲットを図2eに黄色で示した。このように、共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rで取得した画像に対してNIS-Elementsの画像解析ツールを用いることで、興味のある領域のシナプス部位を同定し、その個数密度を計測することが可能である。解析結果として、それぞれの検出点の数を表1に示した。

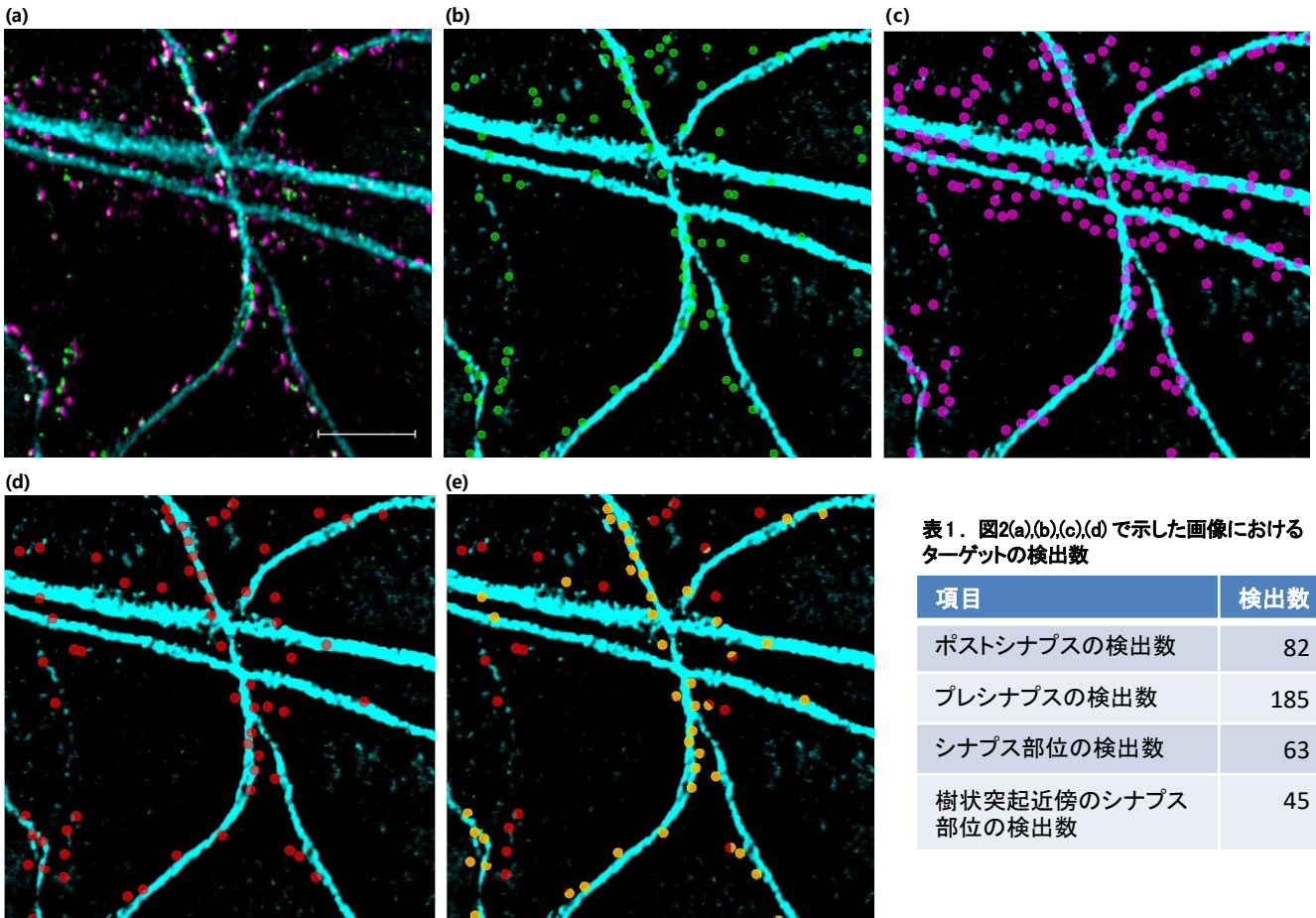


表1. 図2(a),(b),(c),(d)で示した画像におけるターゲットの検出数

項目	検出数
ポストシナプスの検出数	82
プレシナプスの検出数	185
シナプス部位の検出数	63
樹状突起近傍のシナプス部位の検出数	45

図2. 樹状突起近傍に存在するシナプス部位の特定

- (a) 図1aの全体像の一部を抜き出した画像スケールバー：5 μm
 (b) ポストシナプスの位置を特定した様子を、緑色の丸印で示す。
 (c) プレシナプスの位置を特定した様子を、桃色の丸印で示す。
 (d) ポストシナプスとプレシナプスの隣接した位置、シナプス部位を特定した様子を赤色の丸印で示す。
 (e) 樹状突起近傍に存在するシナプス部位を特定した様子を、黄色の丸印で示す。

まとめ

共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rは、広視野であるという特長によって、一つの視野で観察できる領域が広いため、観察対象を大きく撮像することができ、効率的な標本のナビゲーションが可能である。また、撮像した画像は8Kという高いピクセル解像度を有しており、興味のある領域を拡大した場合も、ターゲットの局在を正確に把握することができる。取得後の解析についても、イメージングソフトウェア NIS-Elementsを使用することにより、定量的な解析に素早く対応でき、実験のワークフローを改善することが可能である。

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX R

業界最高水準の高速・高解像度・広視野の共焦点イメージングを実現。研究のあらゆる場面における定量解析もNIS-Elementsソフトウェアでサポート。

- ・高速：最速毎秒720フレーム
（レゾナントスキャン；2048 x 16画素）
- ・高解像度：
最高8K：ガルバノスキャン
最高2K：レゾナントスキャン
- ・高スループット：視野数
25mmの超広視野

