

マウス皮質興奮性ニューロンの3D高解像度共焦点イメージングにより、動態、制御、機能の異なる多様な樹状突起棘を解明

シナプス可塑性における樹状突起棘の新たな役割

樹状突起スパインはきわめて動的であり、その形状や数の変化は、認知過程だけでなく、精神神経疾患におけるシナプス可塑性の要因となり得る。新しいエビデンスにより、スパインからの一時的な細長い突起、いわゆる樹状突起棘(dendric spinule)が、シナプスの活動の変化に応じて、シナプス可塑性を仲介する可能性があることが示されている。棘突起 (spinule) は数十年前に電子顕微鏡 (EM) によって初めて観察されたが、通常は1 μm 未満の長さであり、フィロポディアよりも小さく、大きなキノコ様スパインに多く見られる (Petralia et al., 2015)。これはナノスケールのサイズであるため、観察には従来の共焦点顕微鏡の回折限界を超える解像度が必要である。このため、ほとんどの棘突起の研究では、固定した脳切片を電子顕微鏡で観察してきたが、これでは一時点のスナップショットしか取得できない。棘突起の制御メカニズムや機能をより深く理解するには、棘突起の動態のライブタイムラプスイメージング研究が必要である。しかし、超解像顕微鏡の高速3Dイメージングへの応用の初期段階では、特殊な蛍光色素や高出力レーザーが必要であることや、Zスタック取得のための速度の不足、高コストなどがネックであった。本アプリケーションノートでは、ニューロンを強力な蛍光で標識し、Nikonレーザー स्कаниング共焦点イメージングのパラメーターを最適化し、取得画像に対してNIS-Elementsソフトウェアにより反復3Dデコンボリューションを行った (Zaccard, et al., 2021)。この手法により、シナプス前およびシナプス後マーカーと関連付けて個々の棘突起を可視化し追跡することが可能になり、動態、長さ、寿命、制御、機能などの異なるさまざまな棘突起のサブタイプが明らかとなった (Zaccard et al., 2020)。

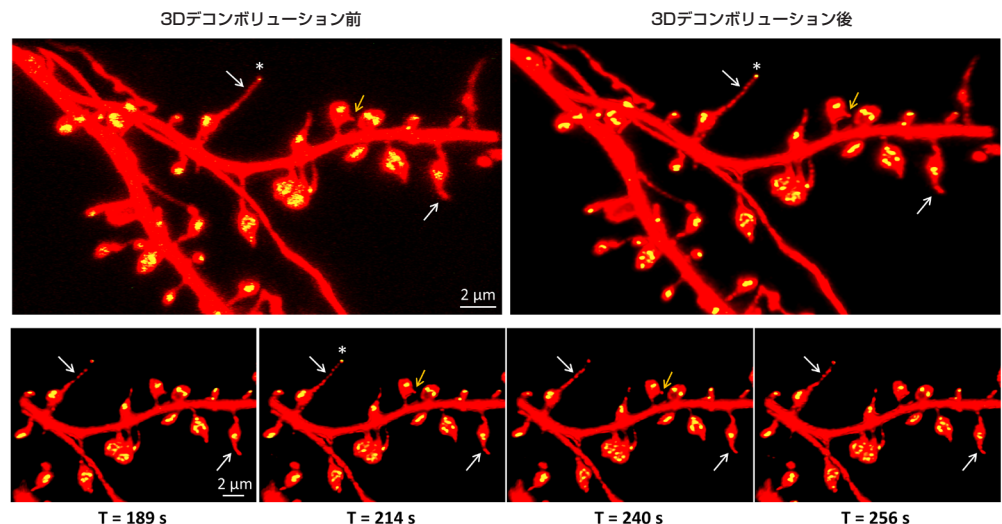
棘突起の動態を、レゾナントスキャンによりライブタイムラプス高解像度共焦点イメージング

電子顕微鏡を利用したこれまでの研究では、棘突起はシナプス後肥厚 (PSD) 内の複雑な穿孔から生じているとの報告や、穿孔のないPSDの端部またはスパイン頸部から発生していると説明されている (Zaccard et al., 2020)。棘突起の発生をPSDと関連付けて調査するために、mRubyセルフフィルとGFPタグ付き「イントラボディ」をエンコードしたプラスミドを、単離マウス皮質ニューロンに化学的にトランスフェクションし、内因性PSD95を標識した (Gross et al., 2013)。レゾナントスキャン共焦点イメージングのパラメーターを最適化し、画像取得後にNIS-Elementsソフトウェアで3Dデコン

ボリューション処理することにより、Zスタックあたり8秒以下の高速取得を実現し、棘突起とPSDの複合体の解像度を向上した (図1、上)。これらの結果により、キノコ様スパインによって形成された棘突起の多くが予備的かつ一時的なものであり、数秒間しか存在せず、単純なPSDの端部の近くで発生していることが示された (図1、下)。興味深いことに、細長く長寿命な一部の棘突起は、複雑な断片化したPSDに結合しており、PSDの断片をトラフィックできた (図1、下)。一部の棘突起は、局所的な Ca^{2+} 濃度上昇によって個々に制御され、シナプス後のRac1-GEFカリリン-7は、スパイン頭部の同じ場所において棘突起の形成、伸長、再発を制御していた (データは示していない)。

図1. 短寿命および長寿命の棘突起とPSDの関係の、ライブタイムラプス高解像度共焦点イメージング

細胞処理：基本条件、緑：GFP-tagged anti-PSD95 intrabodies、赤：mRuby cell fill
 プラスミド：p-mRuby-N1；Michael Davidson提供 (Addgene plasmid # 54581)、pCAG_PSD95およびFingR-eGFP-CCR5TC；Don Arnold提供 (Addgene plasmid # 46295)
 対物レンズ：Plan Apo Lambda 100X、スキャナー：レゾナント、ラインアペレーティング：4X、Zスライス数：43、Z取得間隔：~8秒、取得時間：600秒
 白矢印：長寿命の棘突起、黄矢印：短寿命の棘突起、アステリスク：PSDの断片



固定した定常状態と活性化状態のニューロンにおける、棘突起とシナプス前終末の共局在を、ガルバノスキャンにより高解像度共焦点イメージング

次に、定常状態および活性化状態の単離マウス皮質ニューロンに対して高解像度共焦点イメージングを行い、スパイン頭部近位および遠位のシナプス前終末と棘突起との共局在を調査した。GFPをトランスフェクションしたニューロンを、定常状態または30分間のNMDAR活性化の後に固定した後、シナプス前マーカであるbassoonを免疫染色し、phalloidin-647染色によりF-アクチンをベースにした構造を標識した。ガルバノスキャン共焦点イメージングのパラメーターの最適化とラインアベレーシングを行い、3Dデコンボリューションを行うことにより、bassoonで標識したシナプス前終末およびphalloidinで標識した軸索と、棘突起

との関係性を可視化することができた(図2)。棘突起を長さによりグループ化し、基底状態と活性化状態における近位および遠位のシナプス前終末の接触数を定量化した。この結果により、短い棘突起(1 μm以下)の大部分が予備的であり、シナプス前終末に接触していないことが示された。活性化により、棘突起の数、長さ、および伸長した棘突起がスパイン頭部遠位のシナプス前終末と接触する頻度が増加した。フィロポディアに似た長い棘突起は伸長して複数の遠位終末に接触し(図2、左)、キノコ様の棘突起は概して単一の遠位終末に接触した(図2、右)。また、シナプス前マーカとシナプス後マーカは、いずれも長寿命のキノコ様の棘突起の先端と共局在しており(データは示さず)、二次シナプスの形成を示唆している。

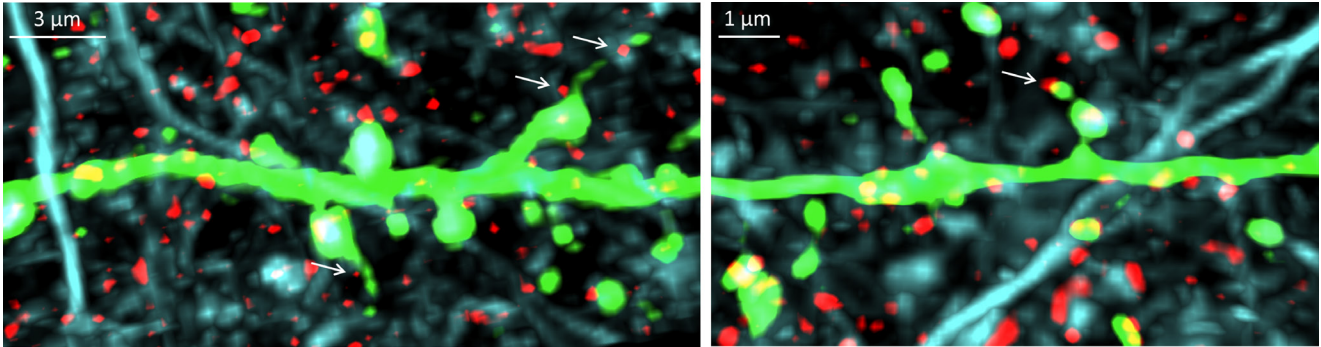


図2. 固定サンプルの高解像度共焦点イメージングにより、伸長した棘突起と遠位シナプス前終末との共局在を解明

細胞処理: GFPをトランスフェクションした単離皮質ニューロンを、APV含有培地とNMDAを活性化するAPV除去培地で30分間処理し、メタノールを含まないホルムアルデヒドで固定した。

緑: GFP cell fill, 赤: Bassoon, 遠赤(青で表示): F-アクチン

プラスミド: pGFP; Stephen Mayfield提供 (Addgene plasmid #64904)

抗体: 抗bassoonモルモットポリクローナル (Synaptic Systems, Cat# 141001)、F-アクチン染色: Alexa Fluor 647 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Cat# A22287)

対物レンズ: Plan Apo Lambda 100X, スキャナー: ガルバノ、ラインアベレーシング: 2-4X, Zスライス数: 46 (左画像)、34 (右画像)

矢印: 棘突起と共局在している、bassoonで標識したシナプス前終末

一部の棘突起における動態と機能の相違

マウス皮質興奮性錐体ニューロンの、ライブタイムラプス高解像度共焦点イメージングにより、キノコ様スパインから生じる棘突起の大部分が短命、動的、予備的であり、単純なPSDの端部の比較的近くから発生していることが明らかになった。逆に、一部の細長い長寿命の棘突起は、PSDの断片をトラフィックし、二次シナプス接続を形成できることを示した。固定サンプルの、シナプス前終末と関連付けて棘突起を定量化することにより、活動依存性の細長い棘突起が、スパイン頭部遠位のシナプス前終末と優先的な接触を形成することが明らかになった。細長い棘突起は、樹状突起スパインの形状と機能を部分的に模倣した、フィロポディアやキノコのような形状を発達させた。これらのデータは、伸長した安定的な棘突起が、活動に反応して二次シナプスを形成することを示唆しており、認知過程や神経精神疾患でのシナプス接続の変化における棘突起の機能に関して、将来的な研究への道を開いている。棘突起の高解像度共焦点イメージングの基本プロトコルは、強力な蛍光標識や、共焦点イメージングのパラメーターの最適化、3Dデコンボリューションを活用することで、超解像顕微鏡を使用せずに、棘突起やスパイン頸部などの微細なニューロン構造を可視化できる (Zaccard et al., 2021)。高解像度共焦点イメージング法は、超解像システムを必要とせずに、健康や疾患において、F-アクチンをベースにした細胞膜突起などの一時的なナノスケールの生物学的構造を研究するために、広く適用することが可能である。

謝辞

画像とテキストは、ノースウェスタン大学ファインバーグ医学院神経科学部の研究助教授であるColleen Zaccard博士のご厚意により提供いただいた。画像は、ノースウェスタン大学のCenter for Advanced Microscopy/Nikon Imaging Centerで撮影した。

参考文献

1. GROSS, G. G., JUNGE, J. A., MORA, R. J., KWON, H. B., OLSON, C. A., TAKAHASHI, T. T., LIMAN, E. R., ELLIS-DAVIES, G. C., MCGEE, A. W., SABATINI, B. L., ROBERTS, R. W. & ARNOLD, D. B. Recombinant probes for visualizing endogenous synaptic proteins in living neurons. *Neuron*, 2013 Jun 19;78(6):971-85.
2. PETRALIA, R. S., WANG, Y. X., MATTSO, M. P. & YAO, P. J. Structure, Distribution, and Function of Neuronal/Synaptic Spinules and Related Invaginating Projections. *Neuromolecular Med.* 2015 Sep;17(3):211-40.
3. ZACCARD, C. R., SHAPIRO, L., MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D., PRATT, C., MYCZEK, K., SONG, A., FORREST, M.P. & PENZES, P. Rapid 3D Enhanced Resolution Microscopy Reveals Diversity in Dendritic Spinule Dynamics, Regulation, and Function. *Neuron*. 2020 Aug 5;107(3):522-537.e6.
4. ZACCARD, C. R., KIRCHENBUECHLER, D., YOON, S., ARVANITIS, C., & PENZES, P. Protocol for live enhanced resolution confocal imaging of dendritic spinule dynamics in primary mouse cortical neuron culture. *STAR Protoc.* 2021 Apr 5; 2(2):100427.

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

AX/AX Rは、従来機比4倍の8K x 8K画素の高解像度画像を実現。対角25 mmの広視野でサンプルの広範囲を一度に取得でき、光毒性を低減します。AX Rのレゾナントスキャナーは、2K x 2Kの高解像度を実現。毎秒720フレーム(2048 x 16画素)の高速取得により、生きたサンプルの動態を逃さずとらえます。

