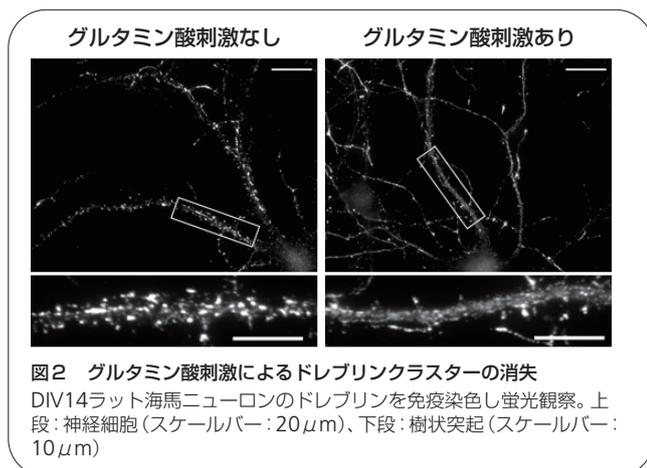
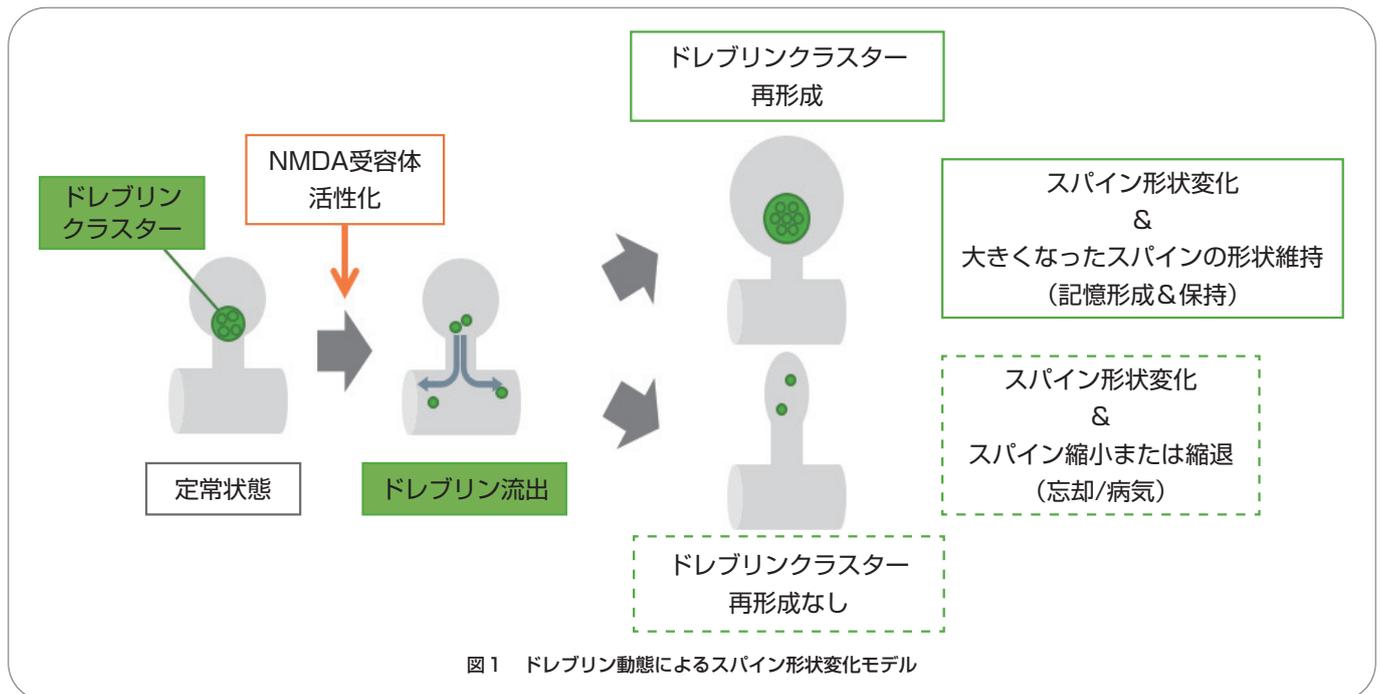


DNA-Paintによる2重染色神経細胞の超解像イメージング

群馬大学大学院医学系研究科薬理学分野の小金澤紀子先生（生命科学）は、認知機能の最小単位と言えるシナプス部位に局在する数多くのタンパク質のうち、アクチン結合タンパク質の一種であるドレブリンに着目して研究している。成熟神経細胞のシナプス後部（樹状突起スパイン）にはドレブリンが集積しているが、シナプス機能不全が起これるとその集積が見られなくなる。また、グルタミン酸などによりNMDA受容体が活性化されると、ドレブリンの集積が一過性に消失することも知られている（図1および図2）。小金澤先生は、こうしたドレブリンの動態に着目し、認知機能へ及ぼす影響を検証している。

本アプリケーションノートでは、グルタミン酸刺激によるドレブリンの局在変化を超解像顕微鏡N-STORMを使用して画像取得し、クラスター解析により定量評価した例を紹介する



実験の概要

DNA-Paint (Massive Photonics社) を用いて神経細胞を2重染色し、樹状突起（抗MAP2抗体使用）とドレブリンを観察した。グルタミン酸で刺激した場合と未処理の場合における、ドレブリンの局在の変化を画像取得し、それをクラスター解析により定量的に評価した。

結果

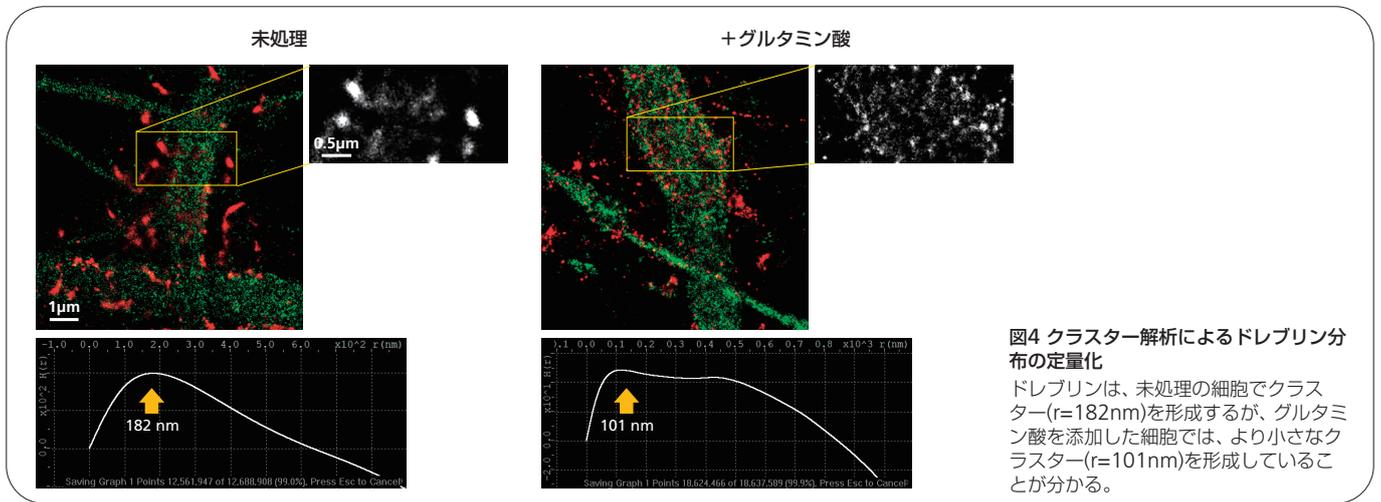
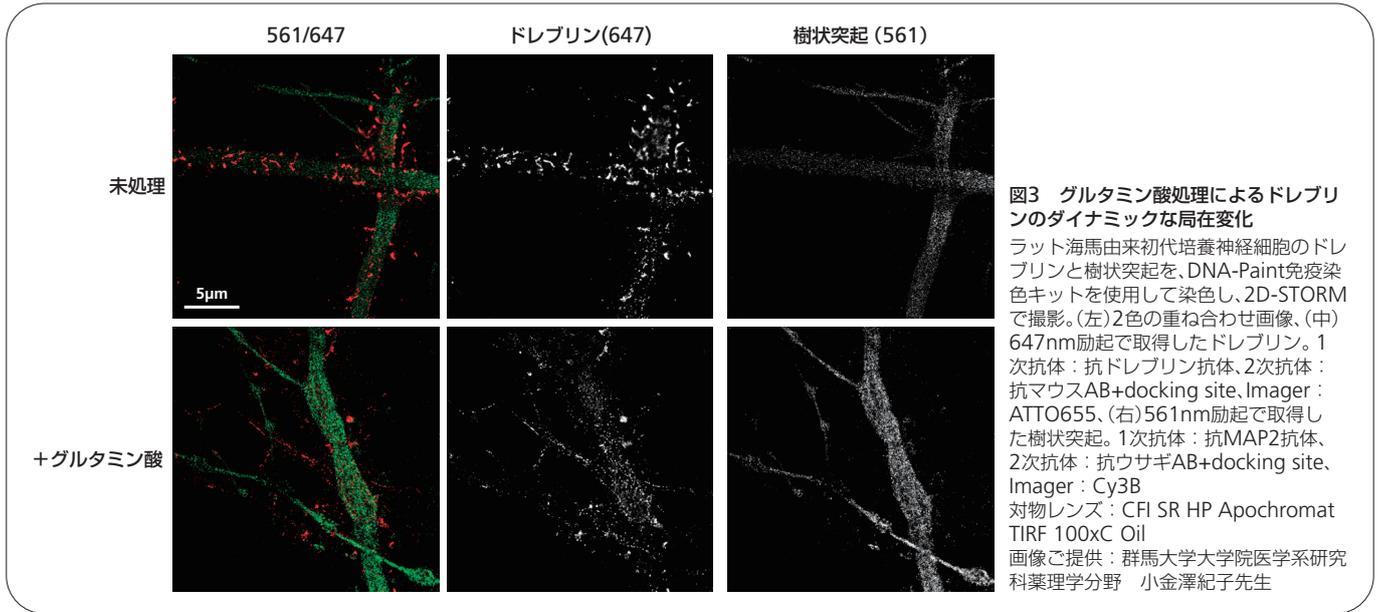
未処理の細胞では、ドレブリンは樹状突起に沿って分布し、従来の蛍光顕微鏡で観察された通り、樹状突起スパイン内に集積していることが示された。一方、グルタミン酸を添加(100 μ M、10分間)してNMDA受容体を刺激した細胞では、ドレブリンが樹状突起上に分布する様子が観察された。これは、グルタミン酸刺激により、ドレブリンの局在が樹状突起スパインから樹状突起へと変化したことを示唆している(図3)。

またクラスター解析により、グルタミン酸刺激をした細胞では、未処理の細胞よりもドレブリンが小さいクラスターを形成することが分かった(図4)。

まとめ

2重染色を利用した観察により、ドレブリンが樹状突起上またはその周辺部のいずれに局在しているかを1分子レベルの精度で視覚化できた。また、グルタミン酸刺激の有無におけるドレブリンの局在の観察だけでなく、その分布の違いを定量評価することができた。

また、STORM観察は、蛍光分子の明滅現象を制御し画像取得する手法であるが、明滅現象を生じやすい蛍光色素は限られているため、色素の選択が、多色STORM観察における課題の一つであった。DNA-Paintを使用することにより、2種類の分子の相関を捉えることができるうえ、褪色のないイメージングが可能である。



製品情報

超解像顕微鏡 N-STORM

ローカリゼーション法の一つであるSTORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)を採用し、従来の光学顕微鏡の約10倍の解像度を実現した。細胞内小器官の構造を1分子レベルで観察することが可能。

水平解像度：約20 nm

Z軸方向解像度：約50 nm



クラスター解析機能

超解像顕微鏡で取得した画像上において、目的の範囲をROIで指定することにより、輝点の分布パターンを自動的に解析することが可能。ナノスケールの精度での画像取得に、さらに定量的な評価も加わることで、画像から得られる情報の信頼性を大きく向上できる。

