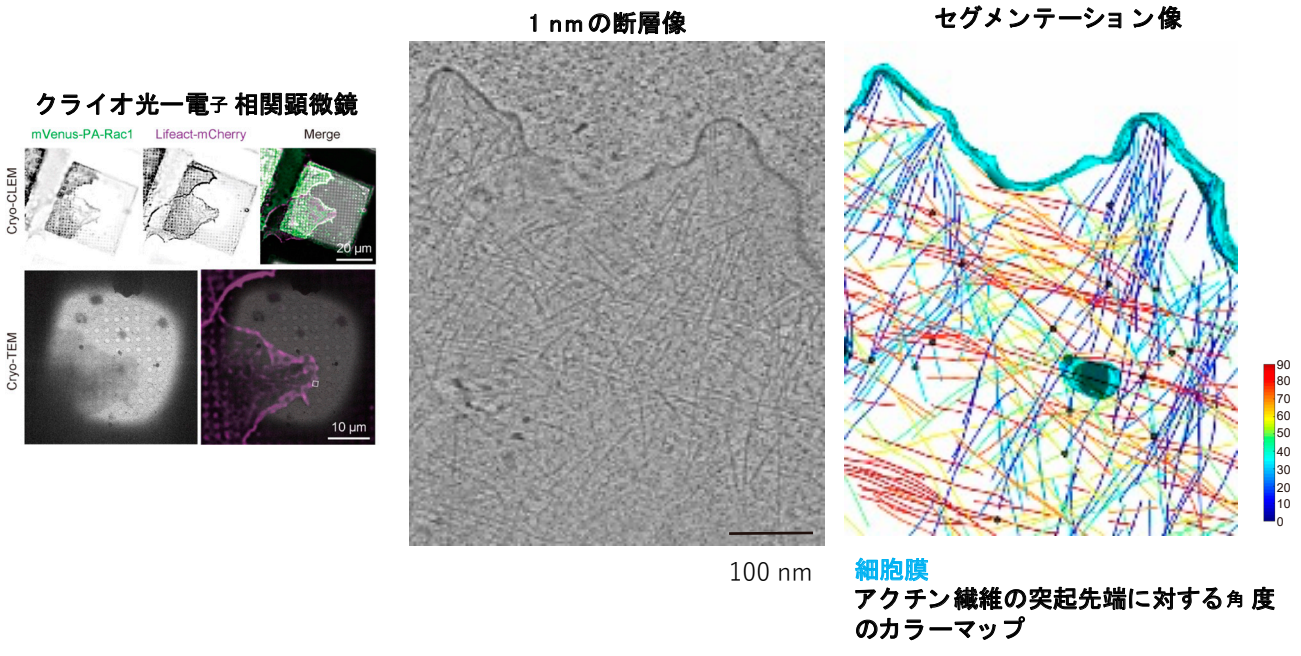
103　細胞内アクチン線維極性と重合端の超微細構造解析	稲葉　弘哲

【目的】葉状仮足は枝分かれしたアクチン細胞骨格からなる扁平に広がった細胞突起であり、血球細胞の遊走、神経軸索ガイダンス、癌の浸潤転移、貪食作用など、幅広い生命現象にみられるアメーバ運動・細胞異動の基本構造である。したがって、その形成過程におけるアクチンの重合・分岐の機序や構造を明らかにすることは、細胞生物学的にも病理学的にも非常に重要である。従来、アクチン細胞骨格の微細構造の観察には電子顕微鏡が用いられているが、古典的な電子顕微鏡法では固定・染色が必須であり、アーティファクトが生じる可能性があった。近年のクライオ電子線トモグラフィー法の発展は、細胞内の微細構造を非破壊・無染色で鮮明に観察することを可能にした。さらに、最新の画像解析法と組み合わせることで、細胞内その場でのタンパク質、タンパク質複合体の立体構造解析が推進されている。しかし、これらの技術的基盤は十分に確立されていない。本研究では、葉状仮足のクライオ電子線トモグラフィーを取得し、細胞内におけるアクチン線維の極性の決定や、重合端の構造に着目した構造解析手法を確立することを目的とした。

【方法】COS-7 細胞をラミニンでコートした電子顕微鏡用のグリッド上で培養し、アクチンマーカー（Lifeact-mCherry）と、Rac1 光スイッチ（mVenus-PA-Rac1）を遺伝子導入した。青色光を 2 分間照射することで、葉状仮足形成を誘導し、急速凍結した。クライオ蛍光顕微鏡により、葉状仮足を同定し、その箇所をクライオ電子顕微鏡で連続傾斜像を撮影した。SIRT（Simultaneous Reconstruction Technique）法により三次元再構築し、機械学習等で細胞内構造をセグメンテーションした。このセグメンテーション像を参照し、アクチンの枝分かれ部位を同定し、葉状仮足内のアクチンネットワークを解析した。

【結果】3 細胞から 16 個のトモグラフィー像を取得した。機械学習による細胞膜のセグメンテーションと、テンプレートマッチングによるアクチン繊維、微小管のセグメンテーションを行う方法をそれぞれ確立した。葉状仮足においてアクチン繊維は細胞先端に対して 15°～30°が最も多かったが、突起先端と並行に走行する長いアクチン繊維も多く認められた。アクチン繊維の枝分かれは約 6 μm に 1 箇所存在した。突起先端で、細胞膜が大きく突出している箇所では、数本のアクチン繊維が糸状仮足様に束化されていた。しかし、その成長端においても特殊な構造は同定できなかった。一方で、葉状仮足の起点となる細胞の裏打ちのアクチン束の内側には、管状の小胞体と、それに並走する微小管が観察できた。

クライオ電子線トモグラフィーによる葉状仮足内アクチン細胞骨格の可視化



103. 細胞内アクチン線維極性と重合端の超微細構造解析

稲葉　弘哲

三重大学 大学院医学系研究科 生命医科学専攻 組織学・細胞生物学講座

Key words：アクチン細胞骨格，細胞運動，クライオ電子線トモグライフィー，Rac1

緒　言

アクチン細胞骨格は細胞の運動や形態形成を司る細胞骨格で、アクチン結合蛋白質による重合・脱重合の制御や架橋・束化などによって様々な形態のネットワークを形成する。白血球や線維芽細胞などが培養皿のような二次元平面上で細胞移動する際には、細胞先端に薄いシート状の細胞突起である葉状仮足を形成する。この葉状仮足の形成もアクチン細胞骨格が担っており、アクチン繊維の枝分かれの多い構造と考えられている。このようなシート状のアクチン細胞骨格は、細胞移動だけでなく、エンドサイトーシスなどの幅広い細胞運動で共通してみられる基礎的な構造であり、免疫応答や初期発生、癌の浸潤・転移などにおいて重要である［1，2］。従って、葉状仮足の構造やダイナミクスを理解することは、細胞生物学的にも病理学的にも非常に重要である。葉状仮足のアクチンの構造は三次元的に非常に複雑であり、光学顕微鏡ではアクチン繊維１本１本を分解することは困難である。そこで、電子顕微鏡による観察が盛んに行われていたが、古典的な電子顕微鏡法では化学固定・染色が必須であり、この過程においてアーティファクトが生じる可能性があった。

クライオ電子線トモグラフィーは、急速凍結法によって生体高分子の構造を維持したまま凍結固定し、クライオ透過型電子顕微鏡で CT スキャンのように連続傾斜像を撮影し、nm 分解能で 3 次元観察する技術である。近年の技術革新により細胞内の微細構造を非破壊・無染色で鮮明に観察することが可能となった［3，4］。葉状仮足は、50～200 nm と非常に薄い構造であることから、固定後に収束イオンビームなどで掘削することなく、クライオ電子線トモグラフィーに供することのできる理想的な標的の１つとして、複数のグループから報告されている［5～7］。しかしながら、多くの研究では常に運動をしている魚の表皮細胞を用いているため、既に出来上がっている葉状仮足を観察しており、新たに形成される葉状仮足を観察できていない。また、試料の厚さの問題から、化学固定して界面活性剤で細胞膜を破壊した試料を観察しているという問題点があった。

新たに形成された葉状仮足を観察するためには、急速凍結後にそれが明確に判断できる必要がある。そこで、本研究では葉状仮足形成の上流因子である Rac1 の光遺伝学ツール、PA-Rac1 を用いることとした。PA-Rac1 による葉状仮足形成は、細胞のほぼ全周から起こるため、自発的な形成と明確に区別することができる。本研究ではこの光遺伝学ツールと光―電子相関顕微鏡法、クライオ電子線トモグラフィーにより、細胞膜を維持したまま、新たに形成された葉状仮足のアクチンネットワークを解析することを目的とした。さらに、最新の画像解析法と組み合わせることで、細胞内におけるアクチン繊維の極性や、重合端における微細構造を明らかにすることを目指した。

方　法

1．細胞培養

COS-7 細胞（RCB0539、理研 RBC）は 10%ウシ胎児血清（Biowest）を添加した DMEM 培地（ナカライ）で 5% CO_2 下、37℃で培養した。電子顕微鏡用のグリッドはカーボン支持膜付き金グリッド（200 mesh、R1.2/1.3、Quantifoil）を用いた。培養前に、20 nm の金コロイド（Sigma-Aldrich）で標識をし、0.01%の poly-L-lysine

（ナカライ）と 5μg/mL のラミニン（富士フィルム和光）でコート処理した。コート処理したグリッドを 3D プリンターで作製したグリッドホルダーに静置し、4 分割ディッシュ（SPL）に静置し、1×10^5の COS-7 細胞を播種した。

遺伝子導入は、細胞の播種と同時に Viafect（Promega）を用いて行った。1μg の pTriEx-mVenus-PA-Rac1（Addgene plasmid、#22007）と 0.02μg の Lifeact-mCherry を 50μl の Opti-MEM（Thermo Fisher Scientific）中で混合し、3.6μl の Viafect を混ぜ、15 分室温で静置した後に播種直前の細胞懸濁液に混合した。

2. 青色光の照射と急速凍結

急速凍結は、細胞の播種および遺伝子導入 16 時間後以降に実施した。導入した遺伝子の発現は、蛍光顕微鏡（EVOS M5000 imaging system、Thermo Fisher Scientific）にて直前に確認した。

試料は、Leica GP2 plunger（Leica Microsystems）または、Vitrobot Mark IV System（Thermo Fisher Scientific）により、37℃、湿度 95%の条件で急速凍結した。試料をチャンバーに移行する直前に培地を濾紙で吸い取り、1 度 PBS で洗浄した。チャンバー内でファイバー型 LED（470 nm、1,000 mA、Thorlabs）によって約 1 cm の距離から青色光を 2 分照射し（図 2）、急速凍結直前に 5～10 秒濾紙でブロットした後に、－185℃の液体エタンに浸漬した。急速凍結した試料は、観察に供するまで液体窒素温度下で保存した。

3. クライオ光学顕微鏡

急速凍結した試料の蛍光像は THUNDER Imager EM Cryo CLEM 広視野顕微鏡（Leica Microsystems）で、50 倍の対物レンズを用い、ステージの温度を－190℃に維持して観察した。観察前に、凍結したグリッドに AutoGrids （Thermo Fisher Scientific）を取り付けた。Las X Navigator（Leica）を用いて、まずグリッドの中央を中心とした 1 辺約 2 mm の正方形の範囲を撮影した。その後、目視で PA-Rac1 により葉状仮足を形成した細胞を探索し、0.75μm の間隔で 20μm の Z スタック像を撮影した。撮影には複数のチャネル（transmitted light bright field、reflection、GFP、Texas Red）を使用した。個別に撮影した細胞の画像は、Small Volume Computational Clearing（SVCC）処理をし、TIFF 画像として書き出した。その後の画像処理には Image J/Fiji（NIH）と Adobe Photoshop（Adobe）を用いた。

4. クライオ電子顕微鏡

クライオ電子線トモグラムはボルタ位相板、K3-summit（Gatan）直接検出器を備えたクライオ透過型電子顕微鏡 Titan Krios（Thermo Fisher Scientific）で加速電圧 300 kV にて取得した。顕微鏡は Tomography 5（Thermo Fisher Scientific）で制御した。はじめに、グリッド全体のアトラスを取得し、目的の細胞の場所を同定した。続いて、蛍光像との相関に基づいてトモグラフィーを取得する位置を決定した。最大で－70°～＋70°の範囲で 2°ずつ角度を変えて連続傾斜像を取得した。倍率は 19,500 倍でピクセルサイズは 3.71Å で撮影した。画像 1 枚あたりの電子線量は 1.44 e^-／Å で、連続傾斜像の合計の線量はおおよそ 100 e^-／Å であった。

5. 画像処理

三次元構築前に、質の低い傾斜像は除いた。その後、連続傾斜像から IMOD を用いて、三次元再構築した。顕微鏡像は 20 nm の金粒子を標識としてアラインメントを取り、相互相関により整列した。これらの整列した顕微鏡像から 2 倍のビニングで、Simultaneous Iterative Reconstruction Technique（SIRT）法（繰り返し数 8）により三次元再構築した。CTF 補正は行わなかった。

細胞内構造の抽出はまず、Amira（Thermo Fisher Scientific）で行った。抽出前に、再構築した画像は 2～3 倍ビニングし、ガウスフィルターで処理した。細胞の膜構造は手動で抽出し、アクチン繊維および微小管は Amira の XFiber モジュールを用いて抽出した。繊維のトレースは、細胞膜やグリッドのエッジなどのコントラストの高い構造や、細胞外の空間をマスクした上で行った。自動的なトレースで生じたエラーは IMOD の 3dmod

パッケージを用い手動で修正した。

アクチンの枝分かれ部位は、抽出したアクチン繊維を参照し、トモグラフィー像を 3dmod でみながら決定した。その際、一方のアクチン繊維の終点であること、枝分かれの角度がおおよそ 70°であること、枝分かれの根本に Arp2／3 複合体による密度がみられることを条件とした。

アクチン繊維の定量的解析は、ultrastructural analysis toolbox [8] を用いた。3D モデルの可視化には 3dmod を用いた。アクチン繊維の leading edge に対する相対的な角度による色分けマップは ultrastructural analysis toolbox を用いて作成した。このカラーマップと 3dmod で作成した細胞膜や微小管の二次元図は Adobe Photoshop で重ね合わせた。

グラフは Graphpad Prism 10（GraphPad Software）および MATLAB（MathWorks）を用いて描画した。

結果および考察

1. グリッド上での葉状仮足形成

まず、電子顕微鏡グリッド上で、カバースライド上と同様に青色光の照射による PA-Rac1 の活性化によって、COS-7 細胞が葉状仮足を形成するかについて検討した。細胞外基質として、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンを比較検討したところ、ラミニンを用いた際に葉状仮足が最も基質に沿って伸長した。このことは、薄い試料が必要であるクライオ電子線トモグラフィーにとって重要であるので、基質としてラミニンを用いることとした。図 1 に示すように、青色光の照射によって COS-7 細胞の全周から同時に葉状仮足の形成が観察された。細胞の面積変化を定量化すると図 1c に示すように、照射開始 2 分間で最も面積が拡大した。その後は、全体でみれば葉状仮足を形成した状態であったが、局所的に伸長と退縮とを繰り返していたため、新生された葉状仮足を観察するために照射開始 2 分後に急速凍結することとした。

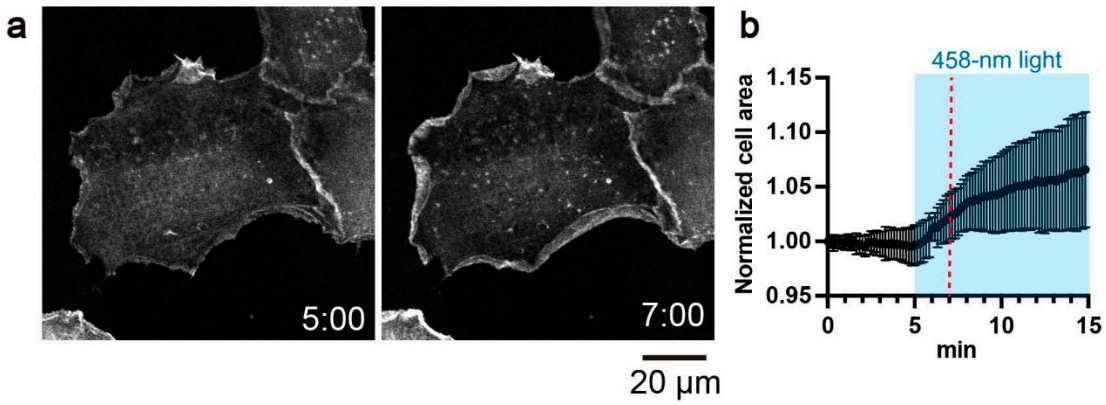


図 1. グリッド上における PA-Rac1 による葉状仮足形成

a） 青色光照射前後（5 分時から照射）の Lifeact-mCherry 像。

b） 細胞面積変化の定量。グラフは 5 つの細胞の平均値±標準偏差で示してある。

2. 凍結試料の作製とクライオ光―電子相関顕微鏡

浸漬装置内にファイバー型 LED を挿入し（図 2a）、青色光の照射と急速凍結を同じ装置内で実施した。電子顕微鏡で観察できるように、ブロットを強めにした結果、乾燥により半数近くのグリッドで細胞が死んでいた。凍結後にクライオ光学顕微鏡で、mVenus-PA-Rac1 が発現しており、かつ、細胞の全周から葉状仮足を形成している細胞を選択した。クライオ電子顕微鏡で観察したところ、細胞が生存していたグリッドのうち 80%程度で氷が厚く、電子線が透過せずに観察できなかった。結果、凍結した 50 枚のグリッドから 2 つのグリッドに由来する 3 細胞を蛍光像と相関をとって観察することができた（図 2b）。

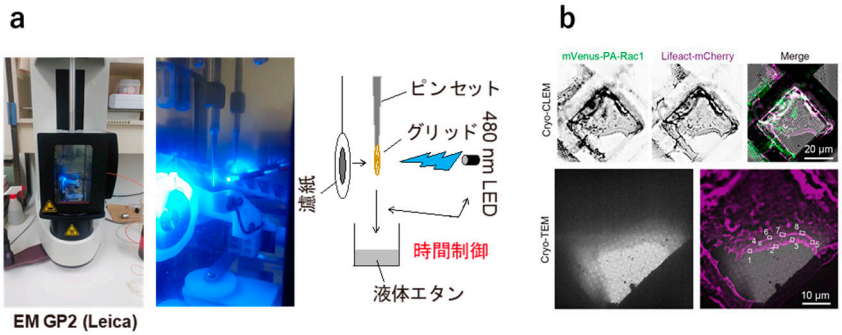


図 2. 急速凍結装置内における青色光照射と光―電子相関顕微鏡法

a) 急速結装置内での光照射の様子（左）と概要（右）。

b) クライオ光学顕微鏡像とクライオ電子顕微鏡像の重ね合わせ。

3. 葉状仮足内のアクチンネットワークの解析

図 2b で白く囲った部分を含めて、葉状仮足の領域から計 16 個のトモグラフィーを取得した。その一例を図 3a、b に示す。アクチン繊維は、突起先端に向かって 15～30°の角度のものが比較的多かったが、予想外に先端に並行に走る繊維も数多く存在した（図 3c）。枝分かれ部位は図 3d に示すように、約 70°で根本に枝分かれに関与する Arp2／3 複合体と推測されるコントラストがみられる像を同定できた。枝分かれは 6 μm のアクチン繊維あたり 1 箇所であり、過去の報告と比べて 1／10 程度であった。枝分かれの頻度は、葉状仮足の形成速度などの物理的要素が関係すると考えられているが、頻度が極端に少ない理由は不明である。突起先端付近の細胞膜とアクチン繊維との関係を詳細に検討したところ、大きく凸になっている領域においては、図 3e に示すように、複数のアクチン繊維が並行して突起先端に対して垂直に走行していた。これらのアクチン繊維間の距離は約 8 nm であり、fascin による架橋を受けていると推測された。

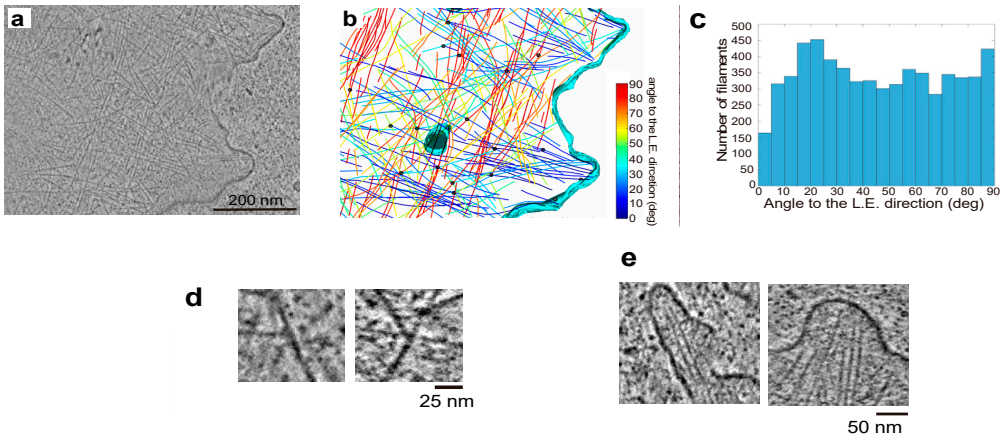


図 3. 葉状仮足のクライオ電子線トモグラフィー

a) 代表的な葉状仮足の断層像。

b) 細胞膜とアクチンのセグメンテーション像。水色が細胞膜、アクチン繊維は先端に対する角度によって色分けした。

c) アクチン繊維の突起先端に対する角度のヒストグラム。

d) 代表的なアクチン繊維の枝分かれ箇所。

e) 葉状仮足先端において、細胞膜が鋭く凸になっている箇所の代表像。

以上のように細胞膜を維持したまま、葉状仮足内のアクチンネットワークを観察することはできたが、観察に適した凍結細胞の割合は非常に少なく、当初計画していた数のトモグラフィーを得ることができなかった。また、アクチンの重合端において、目視で確認する限り何かしらの特徴的な構造は同定できなかった。トモグラフィー像はS／N比が低いことから、サブnm分解能での構造解析を実施するためには多数の同じ構造を集め、平均化する必要があり（サブトモグラム平均法）、トモグラフィー像をさらに取得することが細胞内のアクチン繊維の極性や、重合端における構造を解明するための今後の課題である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科細胞生物学分野の中田隆夫博士、吉原壮悟博士、神戸大学大学院医学研究科生体構造解剖学分野の仁田亮博士、今崎剛博士、大阪大学超高圧電子顕微鏡センター生命　科学研究分野の青山一弘博士、光岡薫博士、大阪大学蛋白質研究所電子線構造生物学研究室の加藤貴之博士、高崎寛子博士、三重大学大学院医学系研究科組織学・細胞生物学講座の後藤英仁である。

本研究の一部はAMEDの創薬等先端支援基盤プラットフォーム（BINDS：課題番号JP21am0101117）および、MEXTのARIM微細構造解析プラットフォーム（課題番号JPMX12220S0015）の支援を受けて実施したものです。

文　献

1） Small JV, Geiger B, Kaverina I, Bershadsky A. How do microtubules guide migrating cells? Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Dec;3(12):957-64. doi: 10.1038/nrm971. PMID: 12461561.

2） Innocenti M. New insights into the formation and the function of lamellipodia and ruffles in mesenchymal cell migration. Cell Adh Migr. 2018;12(5):401-416. doi: 10.1080/19336918.2018.1448352. Epub 2018 May 8. PMID: 29513145; PMCID: PMC6363039.

3） Schneider J, Jasnin M. Capturing actin assemblies in cells using in situ cryo-electron tomography. Eur J Cell Biol. 2022 Jun-Aug;101(3):151224. doi: 10.1016/j.ejcb.2022.151224. Epub 2022 Apr 9. PMID: 35500467.

4） Fäßler F, Javoor MG, Schur FK. Deciphering the molecular mechanisms of actin cytoskeleton regulation in cell migration using cryo-EM. Biochem Soc Trans. 2023 Feb 27;51(1):87-99. doi: 10.1042/BST20220221. PMID: 36695514; PMCID: PMC9987995.

5） Small JV, Auinger S, Nemethova M, Koestler S, Goldie KN, Hoenger A, Resch GP. Unravelling the structure of the lamellipodium. J Microsc. 2008 Sep;231(3):479-85. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02060.x. PMID: 18755003.

6） Vinzenz M, Nemethova M, Schur F, Mueller J, Narita A, Urban E, Winkler C, Schmeiser C, Koestler SA, Rottner K, Resch GP, Maeda Y, Small JV. Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. J Cell Sci. 2012 Jun 1;125(Pt 11):2775-85. doi: 10.1242/jcs.107623. Epub 2012 Mar 19. PMID: 22431015.

7） Chung WL, Eibauer M, Li W, Boujemaa-Paterski R, Geiger B, Medalia O. A network of mixed actin polarity in the leading edge of spreading cells. Commun Biol. 2022 Dec 7;5(1):1338. doi: 10.1038/s42003-022-04288-7. PMID: 36473943; PMCID: PMC9727120.

8） Dimchev G, Amiri B, Fäßler F, Falcke M, Schur FK. Computational toolbox for ultrastructural quantitative analysis of filament networks in cryo-ET data. J Struct Biol. 2021 Dec;213(4):107808. doi: 10.1016/j.jsb.2021.107808. Epub 2021 Nov 3. PMID: 34742832.