

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19328

研究課題名(和文) Rac1光スイッチによるアクチン重合・分岐の急速凍結クライオ電子線トモグラフィ

研究課題名(英文) Cryo-electron tomography of actin polymerization and branching induced by photoactivatable Rac1

研究代表者

中田 隆夫 (NAKATA, Takao)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50218004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光遺伝学とクライオ電子線トモグラフィを組み合わせることで葉状仮足形成におけるアクチン細胞骨格ネットワークの経時的变化を超時空間分解能で解析することを目指した。葉状仮足の形成は低分子量Gタンパク質Rac1の光スイッチで誘導し、そのタイムコースを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、COS-7細胞を急速凍結し、その細胞辺縁部をクライオ電子顕微鏡で連続傾斜像を取得し、三次元断層像を再構成した。これにより、細胞膜や微小管、リボソーム、アクチン線維の可視化に成功した。さらに、細胞膜や微小管、リボソームについては、ディープラーニングによる自動抽出にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉状仮足は枝分かれが豊富なアクチン線維のネットワークからなり、器官形成や創傷治癒、癌の浸潤転移などにおける細胞の移動において重要な役割を担うため、そのアクチンネットワークの再構成過程を詳細に観察することは、細胞生物学的にも病理学的にも意義がある。クライオ電子線トモグラフィによる細胞内構造の可視化は、まだ先行例が少ないが、今後益々重要な技術となることは間違いない。本研究期間中には到達できなかったが、光遺伝学によって電子顕微鏡の弱点である時間軸の導入を達成できれば、学術的に大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to analyze temporal changes of the F-actin cytoskeleton network in the lamellipodia formation with an ultra-spatiotemporal resolution by combining optogenetics and cryo-electron tomography. We induced lamellipodia formation with photoactivatable Rac1 (PA-Rac1) and analyzed its time-course with confocal microscopy. In addition, COS-7 cells were flash-frozen, and continuous tilt series images of the cell peripheral were acquired by cryo-electron microscopy, and 3D tomograms were reconstructed. We could manually segment the plasma membrane, microtubules, ribosomes, and actin filaments in the cell peripheral region. We also tried automatically segment the plasma membrane, microtubules, ribosomes, and actin filaments by deep learning.

研究分野：細胞生物学

キーワード：光遺伝学 クライオ電子線トモグラフィ Rac1 葉状仮足

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の1つである Rac1 は SCAR/Wave 複合体を活性化し、さらにその下流の Arp2/3 複合体を活性化する。Arp2/3 複合体はアクチン線維の枝分かれ構造の形成を引き起こし薄いシート状の突起である葉状仮足を形成する。葉状仮足は、移動する細胞の先端に見られる構造であり、その先端のアクチン重合部位の構造を明らかにすることは、細胞移動や癌の浸潤転移などの理解に重要である。そのアクチンネットワークは光学顕微鏡の解像度では観察することはできず、電子顕微鏡の解像度が必要である。しかし、電子顕微鏡には固定や染色のアーキファクトがあること、生きたまま観察できないというデメリットがあった。

クライオ電子顕微鏡法は、急速凍結した試料を凍ったまま透過型電子顕微鏡で観察する方法で、急速凍結により水の結晶化を防ぎ、生体分子を天然に近い状態に保って観察することができる。しかし、照射できる電子線量が非常に少ないことから、ノイズの多い像しか得られなかった。ところが最近の様々な技術進歩により、高いコントラストで撮影できるようになってきた。また、電子顕微鏡で連続傾斜像を取得し、トモグラムを再構成することにより、高い分解能での三次元観察が可能となってきた。これにより、無損傷・無染色で細胞内のアクチン細胞骨格の観察が可能となってきていた。

光遺伝学は、光応答性のタンパク質を利用し、光照射によってシグナル分子の活性を制御する技術である。我々は光遺伝学を用いると、光照射により細胞内のシグナル分子を同時に活性化できる点に着目した。我々はこの光遺伝学による反応の開始と、クライオ電子顕微鏡の試料作製に用いられる急速凍結法による反応の停止とを連結することで、msec オーダーのタイムコース試料を作製できると考えた。これにより、電子顕微鏡の弱点である時間軸の導入を目指すこととした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は光遺伝学とクライオ電子線トモグラフィにより、前例のない高い時空間分解能での4次元観察法を開発すること、この方法により Rac1 光スイッチによる葉状仮足形成におけるアクチン重合・分岐の素過程を明らかにすることであった。

### 3. 研究の方法

#### (1) 光学顕微鏡による生理的刺激応答時間の測定

COS-7 細胞に Rac1 光スイッチ(PA-Rac1)と F-actin のマーカーである Lifeact-mCherry を Lipofectamine 2000 で導入し、外部 LED 光源の照射により Rac1 光スイッチを活性化し、共焦点レーザー顕微鏡でタイムラプス観察をした。細胞形態および F アクチンの動態をタイムラプス解析した。

#### (2) 電子顕微鏡観察用細胞凍結試料作製法の検討

COS-7 細胞を電子顕微鏡用のグリッド上で培養する方法について検討した。グリッド上で培養するため、金のグリッド Quantifoil R1.2/1.3 を用いた。購入したグリッドをアセトンあるいはトルエンで一晩処理した後、ポリリジンで親水化処理し、電子線トモグラフィのアラインメントに用いる標識として金コロイド粒子(径 20 nm)を添加した。その後、カーボン薄膜をカーボンコーターでコートした。こうして、金コロイド標識付きのグリッドを作製した後に、エタノールで滅菌、蒸留水、ポリリジンで親水化した後に細胞を接着させるため、細胞外基質でコートした。このグリッドをプラスチックディッシュに沈め、通常と同様に COS-7 細胞を培養した。

#### (3) 急速凍結装置によるタイムラプス試料作製

急速凍結装置は神戸大学の Leica EM GP2 を使用した。細胞を培養したグリッドを、直前 PBS で洗い、ピンセットで摘み、EM GP2 にセットした。PBS を 10  $\mu$ l 乗せ、グリッドの裏側からろ紙で一定時間水分を吸い取った後に、液体エタンに浸漬し、凍結した。LED 照射は、EM GP2 の試料をロードするためのピペット入れる穴からファイバー型の LED を通して行なった。

#### (4) クライオ電子線トモグラフィによる立体構造構築

凍結した試料は大阪大学超高压電子顕微鏡センターのクライオ電子顕微鏡 Titan Krios(FEI) で観察した。最大で $-70^{\circ}$  ~  $70^{\circ}$  の傾斜シリーズを Saxton 法にて取得した。1.2 electron/ s とし、1枚あたり 1.5 electron、傾斜シリーズ 70 枚で 100 electron 以下とした。得られた画像は IMOD/Etomo を使用し、3 次元断層像を再構築した。そこから、アクチン線維などの細胞内構造をマニュアルでセグメンテーションした。さらに、EMAN2 の畳み込みニューラルネットワークの機能を用いて、セグメンテーション自動化を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 光学顕微鏡による生理的刺激応答時間の測定

我々は既に PA-Rac1 を使い、COS-7 細胞で葉状仮足形成の観察を行っていたが、より PA-Rac1

による葉状仮足形成を観察しやすい細胞がないか、数種類の細胞について検討した。結果、COS-7細胞がトランスフェクション効率などを考慮すると、最も良く、これまで通りCOS-7細胞を用いることとした。青色光を継続的に照射し、Lifeact-mCherryを観察したところ、青色光照射から2分後までの間で細胞面積の増加が顕著にみられ、その後は伸展と退縮の両方が活発な状態が続いた。Lifeact-mCherryの変化もこの最初の2分間に顕著な変化がみられ、細胞辺縁部の蛍光強度が増し、中央部では蛍光強度が減少した。細胞辺縁部では、先端より0.5~1  $\mu\text{m}$  内側に蛍光強度のピークがみられた。一方、細胞中央部では、元のアクチン骨格の太い束状の構造が壊れ、ドット状の構造が多く現れた。また、PA-Rac1による葉状仮足の形成は、多角形の細胞の頂点部ではなく、ハンモック型の辺の部分から活発に起こることがわかった。これは、ハンモック型の細胞形態を形作っている細胞膜裏打ちの太いF-アクチンの束が葉状仮足形成の起点となっている可能性や、細胞膜の曲率を認識するようなBARタンパク質の機能が関与していることなどが考えられる。

#### (2) 電子顕微鏡観察用細胞凍結試料作製法の検討

培養神経細胞における荒巻ら(Aramaki et al., Microscopy, 2014)の方法を参考に検討した。細胞外基質については、コラーゲン(Cellmatrix Type I-C, 新田ゼラチン)、フィブロネクチン、ラミニンについて検討し、COS-7細胞においてはコラーゲンをを用いることとした。グリッド上に播種してからではトランスフェクション効率が著しく低下したため、トランスフェクションはプラスチックディッシュ上で行い、24時間後にグリッド上に播種した。細胞を培養したグリッドを逆向きにガラスボトムディッシュに沈めて共焦点レーザー顕微鏡での観察を行ない、グリッド上でもPA-Rac1による葉状仮足の形成がガラスボトムディッシュ上と同様にみられることを確認した。トランスフェクションでは、全ての細胞にプラスミドを導入することは難しいため、レンチウイルスやpiggybacを用いてPA-Rac1およびLifeact-mCherryの安定発現株の樹立を目指した。しかし、発現が弱くなってしまったり、多核化がおきるなどしてしまい、トランスフェクションによる一過性の発現が最適であると判断した。

#### (3) 急速凍結装置によるタイムラプス試料作製

急速凍結の氷の厚さは電子顕微鏡のS/Nを大きく左右するため、浸漬直前のろ紙によるプロット時間を検討した。しかしながら、プロット時間と、氷の厚さとの明確な相関関係は見出せなかった。LEDによる照射の方法については道筋ができたものの、本研究期間においては(4)クライオ電子線トモグラフィの検討に想定以上に時間がかかってしまい、タイムラプス観察にまで至らなかった。

#### (4) クライオ電子線トモグラフィによる立体構造構築

凍結したCOS-7細胞の細胞辺縁部の薄い部分に着目し、クライオ電子顕微鏡で観察した。初期にSTEM、TEMで撮影した連続傾斜像からSIRT(Simultaneous Iterative Reconstruction Technique)により再構築した像では、SN比が悪く微小管はトレースすることができたが、F-actinの線維は明瞭に観察することができなかった。研究期間の途中で、ボルタ位相板が大阪大学のTitan Kriosに導入され、コントラストが大きく改善した。2つのトモグラムから手動でのセグメンテーションを行ない、細胞膜、微小管、リボゾーム、アクチン線維のセグメンテーションに成功した。今後のハイスループット化を考え、自動セグメンテーションについてもEMAN2の機械学習を利用し、試行した。細胞膜、微小管、リボゾームについては自動化できたが、アクチン線維は難航しており、今後の課題である。

以上のように、手動セグメンテーションであれば、アクチン線維をセグメンテーションできるところまで技術的に到達した。クライオ電子顕微鏡の観察では、細胞のどのような構造を撮影できているのか判断することができなかった。そのため細胞にLifeact-mCherryを発現させ、凍結後にクライオ光学顕微鏡で観察し、クライオ電子顕微鏡との相関顕微鏡法を行うことが今後必要となる。今後は自動セグメンテーションの手法の確立と合わせて、これらの技術的問題点を解決した後に、タイムラプスクライオ電子線トモグラフィ法の確立を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Moe, Asano Toshifumi, Hosomichi Jun, Ono Takashi, Nakata Takao	4. 巻 506
2. 論文標題 Optogenetic manipulation of intracellular calcium by BACCS promotes differentiation of MC3T3-E1 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 716 ~ 722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.10.107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inaba Hironori, Miao Qianqian, Nakata Takao	4. 巻 296
2. 論文標題 Optogenetic control of small GTPases reveals RhoA mediates intracellular calcium signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100290 ~ 100290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮本孝則、浅野豪文、中田隆夫
2. 発表標題 細胞活動依存的な神経筋接合部形成の検討
3. 学会等名 第124回解剖学会総会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤萌、浅野豪文、細道純、小野卓史、中田隆夫
2. 発表標題 光遺伝学ツールBACCSを用いた骨芽細胞分化メカニズムの制御
3. 学会等名 第124回解剖学会総会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Nakata
2. 発表標題 Optogenetic study of cell polarity - a simple assay
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤萌、浅野豪文、細道純、石田雄之、白見莉沙、清水康広、金香佐和、中田隆夫、小野卓史
2. 発表標題 光遺伝学を用いた骨芽細胞分化メカニズムの制御
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takao Nakata
2. 発表標題 Optogenetics of Signaling Proteins in Neurons
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	稲葉 弘哲  (INABA Hironori)  (80791334)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教   (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	青山 一弘  (AOYAMA Kazuhiro)	大阪大学・超高压電子顕微鏡センター・招へい教授  (14401)	
研究協力者	仁田 亮  (NITTA Ryo)  (40345038)	神戸大学・大学院医学系研究科・教授  (14501)	
研究協力者	今崎 剛  (IMASAKI Tsuyoshi)  (60631661)	神戸大学・大学院医学系研究科・特命助教  (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関