

**【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（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  $15^{\circ}$ ~ $30^{\circ}$  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  $6\mu\text{m}$  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

